

# Фізіологічний журнал

ТОМ 59 № 5 2013

---

Науково-теоретичний журнал • Заснований у січні 1955 р.

---

Виходить 1 раз на 2 місяці

---

## Зміст

<i>Яворський В.А., Лук'янець О.О.</i> Використання серійних тахограм для дослідження викликаної імпульсної активності ізольованих нейронів гіпокампа . . . . .	3
<i>Калініченко О.В., Мишуніна Т.М., Тронько М.Д.</i> Зміни активності цистеїнових катепсинів у лізосомах з тканини папілярних карцином щитоподібної залози з різними біологічними характеристиками . . . . .	11
<i>Носенко Н.Д., Лимарєва А.А.</i> Особливості статевої поведінки самиць шурів за умов гіперандрогенії в пубертатний та постпубертатний періоди . . . . .	20
<i>Головченко І.В., Гайдай М.І.</i> Церебральна гемодинаміка дітей від 8 до 12 років з порушенням рухової активності центрального походження . . . . .	25
<i>Головко В.А., Лебедева Е.А.</i> Участие чувствительного к лидокаину и тетродотоксину тока в генерировании фазы быстрой деполяризации потенциалов действия с низкой ее скоростью у клеток синоаурикулярного узла мыши . . . . .	31
<i>Моренко А.Г., Павлович О.С., Коцан І.Я.</i> Кіркові активаційні процеси у чоловіків із високою та низькою вихідною індивідуальною частотою $\alpha$ -ритму під час сенсомоторної діяльності різної складності . . . . .	41
<i>Родинський О.Г., Зінов'єва О.Г., Мозгунов О.В., Трушенко О.С.</i> Активність інтернейронних пулів спинного мозку за умов експериментального цукрового діабету . . . . .	50
<i>Крученко Ж.О., Пількевич Н.О.</i> Вплив інтраназального введення дофаміну на когнітивні процеси та загальноорухову активність шурів при стресі . . . . .	56
<i>Манько Б.О., Манько В.В.</i> Вплив аденозиндифосфату на дихання мітохондрій in situ ацинарних клітин підшлункової залози шурів . . . . .	61
<i>Ходаківський О.А.</i> Характеристика протиішемічних та мнемотропних властивостей адемоу при модельному гострому порушенні мозкового кровообігу . . . . .	71

Лесик Я.В., Федорук Р.С., Долайчук О.П. Імунобіологічні показники крові за умов додавання до раціону кролів суспензії хлорели, сульфату натрію, цитрату і хлориду хрому . . . . .	78
---	----

## ОГЛЯДИ

Таланов С.А., Ляшенко Т.І., Паталах І.І. Роль NADPH-оксидази в паракринній та аутокринній регуляції функціональної активності тромбоцитів . . . . .	85
---	----

## ПАМ'ЯТНІ ДАТИ

Владимирова І.А., Філіппов І.Б. Внесок академіка М.Ф. Шуби в розуміння механізмів синаптичної передачі в гладеньких м'язах . . . . .	95
--	----

В.А. Яворський, О.О. Лук'янець

## Використання серійних тахограм для дослідження викликаної імпульсної активності ізольованих нейронів гіпокампа

*При тривалому відведенні мембранного потенціалу від ізольованих нейронів гіпокампа, досліджувалися зміни їх генераційної активності у часі. Описано використання тахограм для оцінки електричної активності та запропоновано використання серійних тахограм, аналіз яких дає змогу підвищити достовірність результатів. Виділено три фази зміни імпульсної активності ізольованого нейрона в процесі експериментальної реєстрації: фаза посилення активності, фаза стабільної активності і фаза спаду активності. Встановлено, що в умовах перфорованого patch-clamp фаза стабільної активності починається через 10÷15 хв після отримання цільного контакту та має середню тривалість 30 хв. Показано, що використання серійних тахограм та фаз розвитку активності підвищує якість оцінки значень міжімпульсних інтервалів при вимірюванні імпульсної генерації нейронів. Ключові слова: нейрони гіпокампа, перфорований patch-clamp, потенціал дії, гіпокамп, акомодация, міжімпульсний інтервал.*

### ВСТУП

При вивченні впливу експериментальних факторів на вихідну активність нейрона переважно реєструють зміни у послідовностях генерованих нейроном потенціалів дій (ПД), тоді як випадки застосування альтернативних оцінок поодинокі [1]. Зазвичай вираховують часові відліки моментів генерації, на основі яких будують різноманітні похідні оцінки з урахуванням декількох гіпотез про принципи кодування інформації нейроном [5, 7]. Різнопланові оцінки імпульсної активності в дослідженнях різних авторів вказують на недостатню розробку підходів і методик вимірювань активності нейронів, але навпаки, викликають багато запитань щодо методології підходу до опису імпульсної активності [6]. Загальною проблемою є те, що за однакових умов стимуляції послідовності ПД (що складаються з міжімпульсних інтервалів при одному стимулі деполяризації) ізольованого нейрона можуть істотно різнитися в

двох послідовних тестах, тому достовірність отримуваних результатів зазвичай досягається тільки багаторазовим тестуванням. Однак лише у частині дослідів проводяться повторні реєстрації відповідей нейронів та практично не оцінюється похибка кількісно вимірюваних ознак активності. Відповідно, оцінка імпульсної генерації може набутися суттєвих відхилень, що ставить під сумнів надійність висновків, які робляться дослідником.

У цій роботі пропонуються методичні підходи для отримання та оцінки імпульсної активності нейронів в умовах тривалої реєстрації на прикладі дослідження акомодативних властивостей ізольованих нейронів гіпокампа в конфігурації «перфорований patch-clamp».

### МЕТОДИКА

*Ізолювання нейронів зони CA1 гіпокампа.* Методика отримання ізольованих нейронів гіпокампа щурів у цілому відповідає описаній у

наших попередніх працях [2, 8, 9]. Тварин (30 щурів 14-добового віку) декапітували після анестезії ефіром; мозок швидко витягували та переносили в холодний (4 °C) розчин А. Зрізи гіпокампа товщиною 0,4–0,5 мм нарізали за допомогою леза та витримували 60 хв у розчині Б при кімнатній температурі (21–25 °C), розміщували їх на нейлоновій сіточці в камері; аерація середовища забезпечувалася карбогеном. Ферментативна обробка в розчині Б з 0,1% пронази (тип 23) і 0,1% трипсину («Sigma», США) тривала 20–35 хв без зміни температури середовища. Така послідовність обробки давала змогу при диспергуванні зрізів отримувати ізольовані нейрони потрібної зони, які зберігали невеликі частини апікальних і базальних дендритів і мали сому діаметром 15–20 мкм і довжиною 30–50 мкм.

*Розчини та реактиви.* Розчин А містив (в ммоль/л): NaCl – 120, KCl – 5, HEPES – 10, MgCl<sub>2</sub> – 1, CaCl<sub>2</sub> – 2, глюкози – 25. Розчин Б: NaCl – 125, KCl – 5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,25, NaHCO<sub>3</sub> – 25, MgCl<sub>2</sub> – 1, CaCl<sub>2</sub> – 2, глюкози – 10. Склад піпеткового розчину був таким: цитрат калію трьохзамісний – 60, KCl – 20, HEPES – 10, MgCl<sub>2</sub> – 5; амфотерицин-В розчиняли в диметилсульфоксиді (DMSO) та додавали із розрахунку кінцевої концентрації 1 мг/мл. Всі речовини отримані від фірми «Sigma-Aldrich», США.

*Електрофізіологічні відведення.* Транс-мембранні струми та потенціали вимірювали з використанням стандартної методики patch-clamp в умовах перфорації ділянки клітинної мембрани під дією амфотерицину-Б [4, 9]. Склад позаклітинного розчину змінювали подачею необхідного розчину в камеру з одночасним відкачуванням надлишку перистальтичним насосом з іншого боку камери. Використовували програмне забезпечення «NewProg» (Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України) і підсилювача PC-ONE („Dagan Corp.”, США); мікропіпетки виробляли на пулері P97 („Sutter Instruments”, США).

Тестова серія складалась із 12 прямокутних стимулів тривалістю 2,5 с при підтримуваному потенціалі спокою нейронів –80 мВ. За такої тривалості деполяризації було можливо цілковито оцінити здатність нейронів до генерації (отримували в основному 20÷60 імпульсів ПД у відповідь на подразнення) та визначити показники стаціонарної активності після процесів акомодатії. Частина нейронів генерувала тільки упродовж 1–2 с у відповідь на деполяризацію, і застосований нами протокол давав змогу це виявити. В експериментах переважно використовували 5-секундний період стимуляції в серії для загальної тривалості серії в межах 1 хв. Триваліший період в серії потребував підвищеної уваги щодо зсуву потенціалу спокою та збільшував ризик зміни властивостей генерації клітин під час серійного тестування. Збільшення періоду стимуляції (до 10 с) незначно впливало на генераторну здатність нейронів, однак значно збільшувало час реєстрації до 2 хв, що не є виправданим.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

*Самовільні зміни імпульсної активності.* Найбільш відомою зміною викликаного імпульсної активності нейрона у часі є акомодатійний ефект генерації, який виявляється у поступовому зменшенні частоти генерації ПД при постійному рівні деполяризації та, відповідно, збільшенні міжімпульсних інтервалів (МІ) на графіках тахограм. На рис. 1 цей ефект відображено загальною тенденцією до збільшення значень міжімпульсних інтервалів із збільшенням порядкового номера інтервалу, із більш швидким наростанням МІ на початку тестового стимулу.

Нами запропонована нова методика реєстрації імпульсної активності, при якій замість однієї тахограми ми записували їх серію. Такий підхід забезпечує більш точну характеристику імпульсної активності нейрона та її зміни. Ми виявили, що розмір МІ залежить від кількості раніше прикладених стимулів у

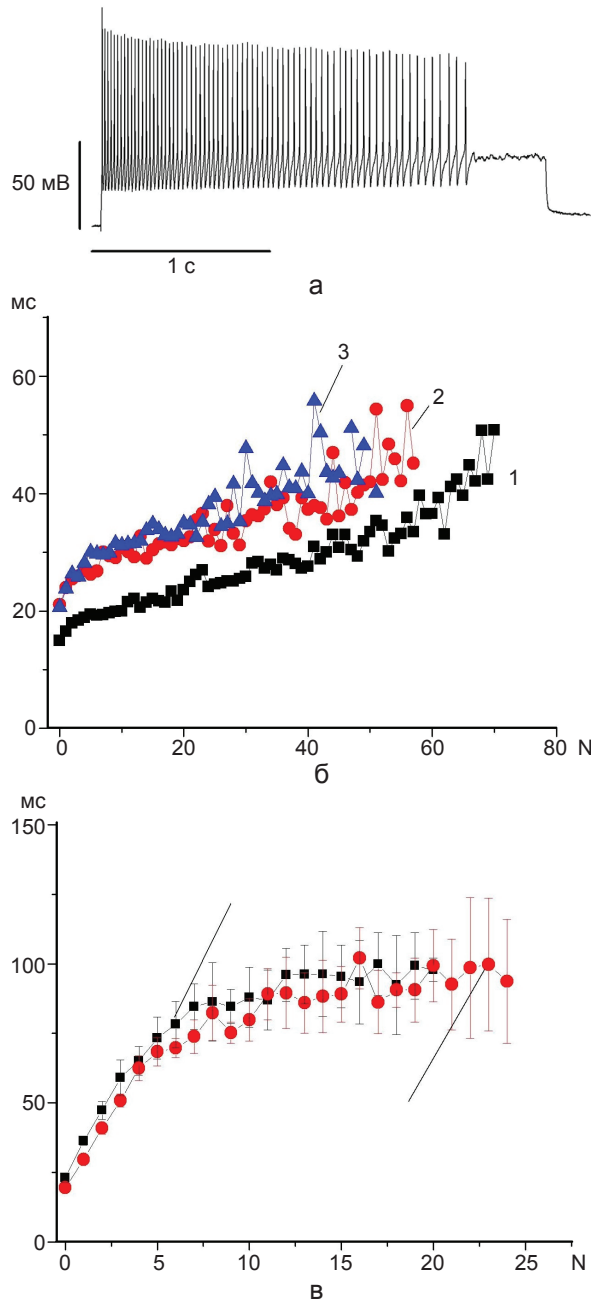


Рис. 1. Імпульсна генерація нейрона та її тахограмний аналіз: а – мембранний потенціал нейрона в умовах подразнення прямокутним стимулом струму 80 пА; б – імпульсна генерація в серії тестувань. За віссю абсцис – номер міжімпульсного інтервала; за віссю ординат – тривалість відповідних міжімпульсних інтервалів; 1, 2, 3 – послідовні тахограми в серії, інтервал між тестами 5 с; в – генерація при інтервалах стимуляції 5 с (1) та 10 с (2), МІ на тахограмах замінені на відповідні середні значення та стандартні відхилення по серії

серії. Значення МІ можуть збільшуватися в серії тестових стимулів, і, в основному, припиняють зростати тільки після двох–трьох тривалих деполяризуючих імпульсів у серії (див. рис. 1, б, криві 1–3 які зняті послідовно). Цей ефект є загальним і був нами зареєстрований у всіх 25 випадках відведень із застосуванням серій деполяризуючих стимулів. Збільшення МІ при другій реєстрації в серії відносно першої було в межах 5÷50%. Тому при оцінці імпульсної генерації нейронів таку зміну активності ми враховували як додаткову акомодативну складову та виключали перші два записи із серії при аналізі тахограм. На рис. 1, б приведено порівняння значень першої та другої тахограм у серії в умовах деполяризуючого стимулу 80 пА із значним збільшенням тривалостей МІ на 50 %. Друга і наступні тахограми в серії достовірно не відрізнялися. В експериментах були застосовані такі показники стимуляції: тривалість стимулу становила 2,5 с, потім нейрон утримувався 2,5 с на коректованому рівні мембранного потенціалу  $-80$  мВ, що блокувало самовільну генерацію; загалом застосовувався інтервал 5 с між реєстраціями в серії.

Подовження інтервалу між тестовими стимулами значно зменшувало ефект впливу серійної стимуляції на значення МІ. За результатами відведень від 2-х нейронів, збільшення інтервалу між реєстраціями в серії з 5 до 10 с зменшувало середні значення МІ на 6 мс (див. рис. 1, в). При подовженому інтервалі стимуляції перша та друга тахограми в серії достовірно не різнилися, проте загальна тривалість серії із 12 стимуляцій збільшувалася до двох хвилин.

Активність нейронів у серії стимуляцій могла супроводжуватися не тільки збільшенням значення МІ, але і зменшенням кількості ПД, які генеруються у відповідь на повторну деполяризацию. При серії прямокутних імпульсів з підвищеною амплітудою 100 пА (біля порогу пригнічення генерації) кількість генерованих ПД поступово зменшувалася

(рис. 2, а); цей ефект може бути відображений як послідовне зменшення кількості точок графіка МІ із збільшенням порядкового номера тахограми (див. рис. 2, б). Кількість ПД зменшувалася при повторній стимуляції з 63-х ПД до стаціонарного рівня в 20 ПД, в серії з 12 стимуляцій амплітудою 100 пА та тривалістю 2,5 с (див. рис 2, в). Такий ефект зменшення кількості генерованих ПД значною мірою залежав від підбору амплітуди деполяризації, при якій стимульована клітина генерує багато ПД і одночасно припиняє таку генерацію до кінця дії стимулу (див. рис. 2, а).

Імпульсна активність нейронів значно залежала від тривалості та умов експериментального відведення і могла мати специфічний характер. В умовах тривалої контрольної реєстрації ми завжди спостерігали поступове збільшення МІ при відведенні активності. Як показано на рис. 3, відбувається зростання значень тахограм активності нейрона у часі при тестовому стимулі 20 пА. У двох нейронів запис потенціалу вказав на припинення імпульсної активності у відповідь на тестовий стимул амплітудою 10 і 20 пА через 30 хв після старту експериментальної реєстрації. Імпульсна активність інших клітин послідовно збільшувалася залежно від умов подразнення: якщо тестові стимули мали амплітуду понад 50 пА, ми спостерігали зростання кількості викликаних ПД та, відповідно, точок послідовності МІ на тахограмах (див. рис. 3 б).

Усереднення тахограм імпульсної активності в серії тестових стимулів однакової амплітуди. Застосування тестової серії із 12 стимулів дає змогу більш точно визначити значення МІ. При аналізі сукупності тахограм для кожного номера МІ можуть бути статистично обчислені та відображені на графіках відповідні значення середньої амплітуди МІ, а також середньоквадратичне відхилення (дисперсія) або похибка.

Між деполяризаційними поштовхами струму нейрон утримували на рівні потенціалу  $-80$  мВ в умовах нульового вхідного

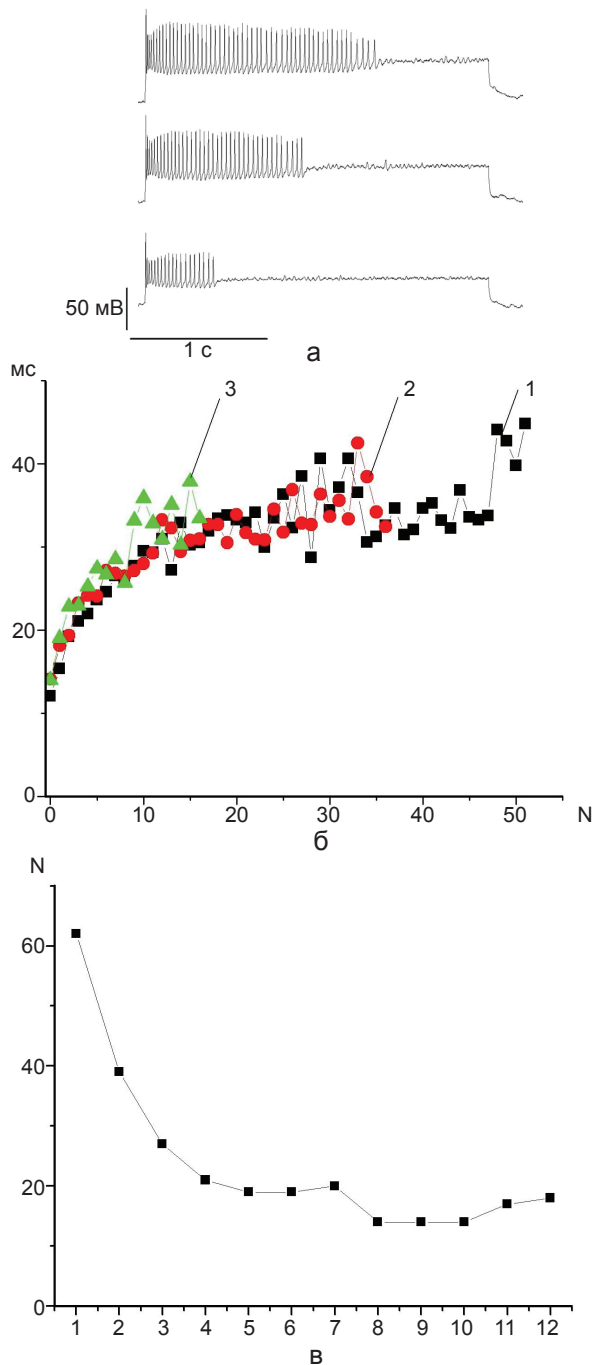


Рис. 2. Динаміка кількості викликаних потенціалів дії в умовах подразнення нейрона серією прямокутних тест-стимулів: а – мембранний потенціал нейрона в повторних стимуляціях, 1, 2 і 3-я реєстрації в серії; б – відповідні тахограми активності, позначення цифрами ті ж. За віссю абсцис – номер міжімпульсного інтервала; по осі ординат – тривалість відповідних міжімпульсних інтервалів; в – динаміка кількості ПД в серії. За віссю абсцис – кількість ПД; за віссю ординат – номер тест-стимулу в серії



струму, можливі самовільні повільні коливання потенціалу клітини коригували вручну під час відведення потенціалу. Невиконання такої процедури могло викликати суттєвий дрейф мембранного потенціалу клітини і навіть незначну імпульсну генерацію. Підтримуваний мембранний потенціал на рівні  $-80$  мВ, з одного боку, є близьким до звичайного потенціалу спокою нейронів *in vivo*, а з

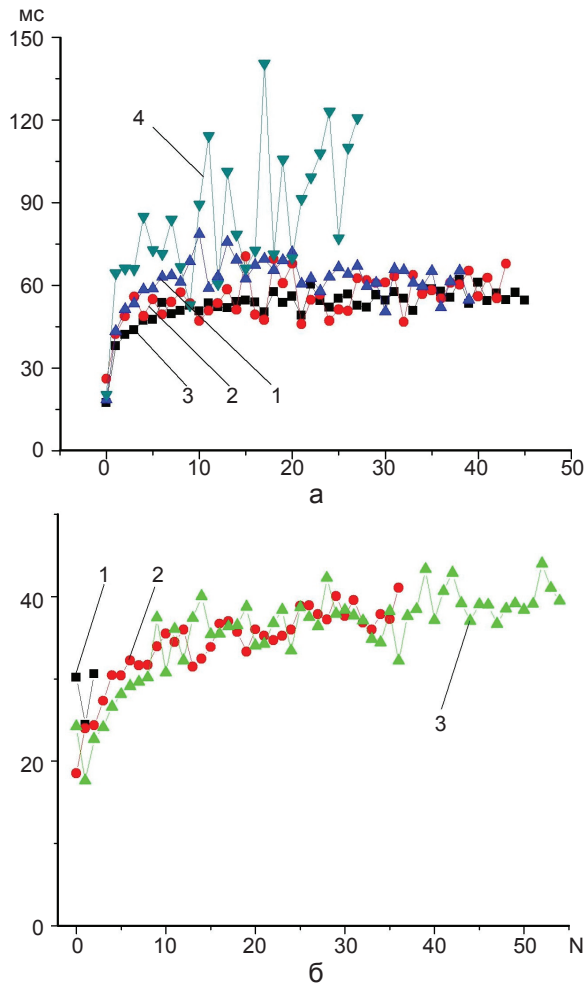


Рис. 3. Вплив часу на імпульсну активність нейрона в умовах тривалої контрольної реєстрації. За віссю абсцис – номер потенціалу дії; за віссю ординат – тривалість відповідних міжпікових інтервалів; а – імпульсна активність нейрона при деполяризації струмом  $20$  пА. 1, 2, 3, 4 – реєстрації на 0-й, 30-й, 60-й і 70-й хвилинах експериментального відведення відповідно; б – динаміка тахограм при тестовому стимулі  $70$  пА в контрольних умовах; 1, 2, 3 – реєстрації на 10-й, 30-й і 50-й хвилинах відведення відповідно

іншого – давав змогу запобігти самовільній активності, покращити точність одержуваних тахограм через зменшення похибки амплітуд МІ. При аналізі серії тестових стимулів ми обчислювали послідовності МІ для кожного поштовху струму. Оскільки не враховувалися дві початкові реєстрації в серії, ми вираховували «усереднену» тахограму із інших  $10$  послідовних тахограм.

Просте усереднення значень серії тахограм дає тахограму із значною дисперсією значень на графіку, тому ми застосовували попередній аналіз значень МІ. Так, при явищах пропуску генерації ПД, усереднення є некоректним, тому що порівнюються неоднорідні значення, отримані при різних паттернах генерації. Тому перед статистичним аналізом проводилася первинна обробка результатів для отримання вибірки даних, рівноцінних за генераційними властивостями. Поодинокі значення МІ, що були аномальними порівняно із загальною послідовністю МІ, вибраковувалися. Також майже завжди не брали до уваги дві початкові послідовності в серії, бо їх значення МІ були значно менше, ніж значення на наступних тахограмах. Статистичну обробку ми виконували тільки для тих порядкових номерів МІ, для яких число значень у різних тахограмах в серії було не менше  $5$ . З цієї причини відкидалося  $3\div 5$  останніх точок усередненої залежності МІ, які мали надмірну дисперсію. Така процедура забезпечувала суттєво плавніший вигляд усередненої послідовності МІ порівняно з окремою тахограмою, а також давала змогу відокремити нехарактерні прояви імпульсної активності.

Відведення імпульсної активності від  $6$  нейронів із застосуванням цього протоколу й інтервалом між серіями в  $10$  хв, показало існування фаз розвитку імпульсної активності як загальної закономірності її зміни з плином часу в процесі реєстрації. Нами було виділено три фази активності окремого нейрона: фаза посилення активності, фаза стабільної активності і фаза згасання активності. Так, після старту відведення ми спостерігали загалом

зростання імпульсної генерації (рис. 4, а); цей період вважали фазою посилення активності. У цій фазі послідовно зменшувався період генерації та зростала кількість ПД у відповідь на поштовх струму тієї самої амплітуди. Тривалість цієї фази становила близько 10 хв. Підвищення активності супроводжувалося зменшенням послідовного опору між піпеткою та клітиною, можливо, через посилення перфорації мембрани амфотерицином. Для двох клітин з групи фази посилення активності не розпізнавалися, оскільки зростання їх імпульсної генерації не було достовірним.

Друга фаза розвитку імпульсної активності тривала від 10 хв до 1 год, в середньому близько 30 хв. У цій фазі спостерігалася добра відтворюваність усереднених послідовностей МІ, без достовірних змін їх форми та абсолютних значень (див. рис. 4, б). Нейрони найбільш ритмічно генерували імпульси із найменшою дисперсією значень МІ. Отримані нами результати показують, що саме фаза стабільної активності має використовуватися для аналізу імпульсної генерації при проведенні експериментів. При цьому деполяризація клітин тестовими імпульсами у 100 пА або більше значно скорочує тривалість фази стабільної активності, та може обмежити час відведення від окремого нейрона.

Реакція нейронів на подразнення посилено змінюється в третій фазі згасання активності, яка характеризується послідовним її зменшенням у часі до припинення імпульсної генерації (див. рис. 4, в). З рисунку видно, що значення МІ генеруючого нейрона мали незначні зміни протягом 60 хв, однак відповідні період і дисперсія на 70-й і 80-й хвилини різко збільшувалися. Після 80-ї хвилини нейрон відповідав на стимул тільки одним ПД, і ми припинили відведення. У фазі згасання активності значно зменшувалася кількість генерованих ПД у відповідь на поштовх струму, що відображалось на тахограмі зменшенням кількості точок МІ.

Ми вважаємо, що для експериментальної реєстрації найкращими є нейрони із тривалою фазою стабільної активності. Для визначення

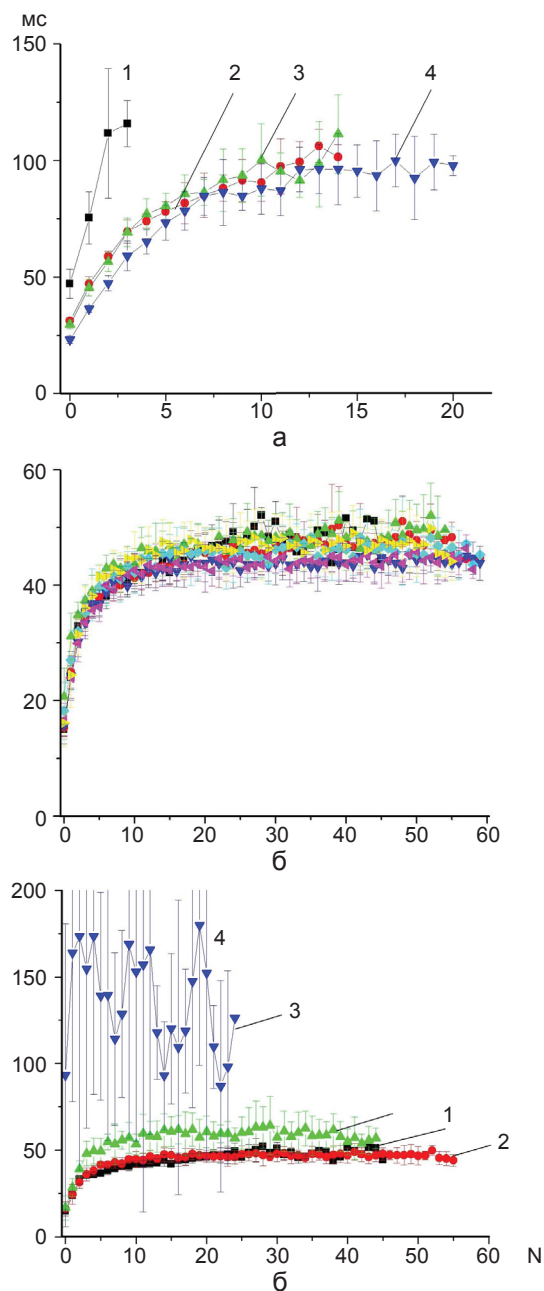


Рис. 4. Фази змін імпульсної генерації в умовах тривалої контрольної реєстрації. За віссю абсцис – номер потенціалу дії; за віссю ординат – середня по серії тривалість міжімпульсних інтервалів (МІ), рисками зазначено відповідне стандартне відхилення по серії; а – фаза посилення активності. Цифрами 1, 2, 3, 4 позначені реєстрації на 0-й, 10-й, 20-й і 30-й хвилини відповідно; б – фаза стаціонарної активності з відтворюваною імпульсною генерацією з 0-ї по 60-ту хвилини, інтервал реєстрації 10 хв; в – підвищення амплітуд МІ і дисперсії генерації на тахограмах в фазі згасання імпульсної активності; 1 – 1-ша, 2 – 60-та, 3 – 70-та, 4 – 80-та хвилини відведення відповідно



тривалості фаз активності необхідно постійно контролювати, чи наявне посилення або її спад аби запобігти ендогенних спотворень реакції нейрона під час тривалої реєстрації. На початку відведення (до фази стабільної активності) слід визначити оптимальну амплітуду тест-поштовхів для протоколу серійної реєстрації. За таких умов отримані усереднені послідовності МІ надійно репрезентують імпульсну генерацію та можуть бути використані у подальшому аналізі.

Контроль фази стаціонарної активності може ґрунтуватися на наших результатах, що у фазах посилення або згасання активності тахограми мають підвищену дисперсію значень. Оцінювати вплив експериментальних факторів слід за допомогою порівняння усереднених значень серії послідовностей МІ, схема побудови яких запропонована вище. У графічній презентації значення мають точніший вигляд порівняно із простою тахограмою.

Усереднені послідовності МІ як емпірична база дослідження можуть бути використані для побудови моделей імпульсної генерації. Послідовності МІ добре апроксимуються функціями як раціонального, так і експоненціального типу залежності, причому достатньо трьох параметрів для їх опису. Тому функціональні моделі активності на основі тахограм є значно простішими, ніж параметричні моделі типу Ходжкіна–Хакслі або Іжikeвича [3], які засновані на обчисленні мембранного потенціалу. У моделях на основі тахограм розрахункові параметри мають наочне фізичне значення, береться до уваги ефект акомодатії та цілком можливий облік випадковості генерації. Такі моделі легко піддаються алгоритмізації і калькуляції в обчислювальних системах.

Наші спостереження вказують на можливу роль внутрішньоклітинних компартментів в імпульсній активності нейронів. Дійсно, тільки набором каналів на поверхневій мембрані клітини важко пояснити зміну ритмічності генерації, наявність фаз активності. Вплив внутрішнього вмісту клітини можна спостерігати, якщо застосувати не перфо-

рацію ділянки мембрани, а конфігурацію реєстрації «на цілій клітині» з проривом мембрани під піпеткою та діалізом клітини. За нашими спостереженнями, нейрони в такій конфігурації відведення були здатні генерувати ПД не більше 5 хв, з розвитком ознак спаду активності з самого початку відведення. Це пояснюється існуванням цитоплазматичних та інших внутрішньоклітинних факторів, рівень яких змінюється під час відведення або за імпульсації нейрона, що в свою чергу впливає на генераційну здатність клітини [10]. В умовах перфорації мембрани, ці фактори виявляються краще стабілізовані, що і є основою для тривалої спроможності клітини до імпульсної реакції на подразнення.

**В.А. Яворский, Е.А. Лукьянец**

#### **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЕРИЙНЫХ ТАХОГРАММ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ВЫЗВАННОЙ ИМПУЛЬСНОЙ АКТИВНОСТИ ИЗОЛИРОВАННЫХ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА**

При длительном отведении мембранного потенциала от изолированных нейронов гиппокампа исследовали изменения генерационной активности во времени. Описано использование тахограмм для оценки электрической активности нейронов и предложено использование серийных тахограмм, анализ которых позволяет повысить достоверность результатов. Выделено три фазы изменения импульсной активности изолированного нейрона в процессе экспериментальной регистрации: фаза усиления активности, фаза стабильной активности и фаза спада активности. Установлено, что в условиях перфорированного patch-clamp фаза стабильной активности начинается через 10–15 мин после получения плотного контакта и имеет среднюю продолжительность 30 мин. Показано, что использование серийных тахограмм и фаз развития активности повышает качество оценки при измерении импульсной генерации нейронов.

Ключевые слова: нейроны гиппокампа, перфорированный patch-clamp, потенциал действия, гиппокамп, аккомодация, межимпульсный интервал.

**V.A. Yavorsky, E.A. Lukyanetz**

#### **USING SERIAL TACHOGRAMS TO MEASURE THE EVOKED IMPULSE ACTIVITY OF ISOLATED HIPPOCAMPAL NEURONS**

In these studies, we investigated the phenomenon of change in impulse activity of isolated hippocampal neurons during

longtime recording. We described the use of serial tachograms during registering the electrical activity of neurons, analysis of which can improve the reliability of data. An analysis of the data identified three phases of changes in impulse activity of isolated neurons in the experimental registrations: a phase of increased activity, phase of stable activity and the phase of declining activity. It is established that in conditions of the perforated patch-clamp the phase of stable activity started at 10-15 minutes after formation of the tight junction and had an average duration of 30 minutes. It is shown that the use of the serial tahograms and phases of activity improves the quality of assessment in the measurement of the electrical activity of neurons.

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Science of Ukraine, Kyiv*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Haag J., Borst A. Active membrane properties and signal encoding in graded potential neurons // *J.Neurosci.* – 1998. – **18**. – P. 7972–7986.
2. Iavorskii V.A., Luk'ianets E.A. [Role of calcium ions in frequency accomodation of rat hippocampal neurons] // *Ukr.Biokhim.Zh.* – 2001. – **73**. – P. 123–127.
3. Izhikevich E.M. Simple model of spiking neurons // *IEEE Trans.Neural Netw.* – 2003. – **14**. – P. 1569–1572.
4. Korn S.J., Marty A., Connor J.A., Horn R. Perforated patch recording // *Methods in Neuroscience* – 1991. – **4**. – P. 364–373.
5. Nirenberg S., Latham P.E. Decoding neuronal spike trains: how important are correlations? // *Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A* – 2003. – **100**. – P. 7348–7353.
6. Oram M.W., Wiener M.C., Lestienne R., Richmond B.J. Stochastic nature of precisely timed spike patterns in visual system neuronal responses // *J.Neurophysiol.* – 1999. – **81**. – P. 3021–3033.
7. Shinomoto S., Shima K., Tanji J. Differences in spiking patterns among cortical neurons // *Neural Comput.* – 2003. – **15**. – P. 2823–2842.
8. Yavorskii V., Kostyuk P., Lukyanetz E. Accommodation properties of isolated hippocampal neurons under conditions of an experimental model of epilepsy // *Neurophysiology* – 2006. – **38**. – P. 175–181.
9. Yavorskii V.A., Lukyanetz E.A. Evoked impulse activity of isolated hippocampal neurons in the perforated patch-clamp configuration // *Neurophysiology* – 2012. – **43**. – P. 417–424.
10. Yavorsky V.A., Lukyanetz E.A. An effect of mitochondrial ionophore CCCP on impulse activity of isolated CA1 hippocampal neurons // *Fiziol.Zh.* – 2008. – **54**. – P. 124.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ*  
E-mail: jva@biph.kiev.ua

*Матеріал надійшов до редакції 04.05.2013*

О.В. Калініченко, Т.М. Мишуніна, М.Д. Тронько

## Зміни активності цистеїнових катепсинів в лізосомах з тканини папілярних карцином щитоподібної залози з різними біологічними характеристиками

*Для з'ясування можливої ролі цистеїнових катепсинів H, B і L у протеолітичних процесах, які сприяють пухлинному росту у щитоподібній залозі, досліджена їх активність у лізосомах, виділених з тканини папілярних карцином. Показано, що для цих ферментів існує певна залежність змін активності від низки біологічних характеристик пухлин. Так, різке зростання активності катепсину H відмічено у лізосомах з тканини карцином категорії T2 і T3, за інтра- і екстратиреоїдної, а також лімфатичної інвазії пухлинних клітин; катепсину B – у лізосомах з тканини карцином гетерогенної будови, особливо при наявності солідних ділянок, порівняно з пухлинами типової папілярної будови та у лізосомах з тканини карцином за їх інтра- і екстратиреоїдної, а катепсину L – за екстратиреоїдної інвазії. Загальною особливістю для вивчених катепсинів є підвищення їх активності в лізосомах з тканини неінкапсульованих карцином. Зазначені ферменти, певно, не беруть участь у інвазії до кровоносних судин і у механізмах метастазування пухлин до регіонарних лімфовузлів: про останнє свідчить відсутність змін активності катепсинів у лізосомах з тканини карцином категорії N1. Отримані результати вказують на різну роль катепсинів H, B і L у тиреоїдному канцерогенезі, де кожен фермент має свою специфічну функцію.*

*Ключові слова:* цистеїнові катепсини B, H, L, папілярні карциноми щитоподібної залози, інвазія.

### ВСТУП

Відомо, що цистеїнові лізосомальні катепсини, поряд з системою активації плазміногену і матриксними металопротеїназами, займають одне з чільних місць у механізмах пухлинного росту. З підвищеною властивістю трансформованих клітин синтезувати і секретувати лізосомальні катепсини пов'язують інвазію і метастазування солідних пухлин різної локалізації.

Загалом вважають, що чим вищий синтез лізосомальних катепсинів, тим агресивніший фенотип має пухлина. Є свідчення про роль цих ферментів не тільки на пізніх, але і на ранніх стадіях її розвитку [26]. Показано, що активація онкогена RAS змінює функцію лізосом [31], локалізація яких у ракових клітинах, особливо у клітинах, які розташовані по

© О.В. Калініченко, Т.М. Мишуніна, М.Д. Тронько

краю пухлини, змінюється з навколоядерної на периферичну [19]. Знайдені відмінності у складі ізоформ ферментів, їх фізико-хімічних і кінетичних властивостей, які проявляються вже на початкових етапах злоякісної трансформації [24]. При цьому показана можливість виходу з лізосом проферментів, які стабільніші і менше підпадають під дію ендогенних інгібіторів, ніж зрілі форми ферментів [20]. Подібні зміни, поряд зі зниженням рН середовища клітини, призводять до переміщення ферментів з лізосом, їх асоціації з мембраною пухлинної клітини і секретії з неї [12, 28, 36].

Основні процеси, що супроводжують участь катепсинів, зокрема і цистеїнових, у деструкції білків позаклітинного матриксу (колагену, еластину, ламініну, фібронектину, колагену IV типу, протеогліканів) і лізису

базальної мембрани, відомі [14, 23, 25], проте залишається нез'ясованою роль конкретних ферментів у прямому протеолізі компонентів позаклітинного матриксу, в інактивації білків міжклітинної адгезії (Е-кадгерину), в ініціації протеолітичного каскаду за участю інших протеаз (матриксні металопротеїнази, урокінази, протеїнази фібринолізу і згортання крові тощо). Результати експериментальних досліджень, проведених на трансгенних моделях пухлин у мишей, дали можливість зробити висновок, що індивідуальні гени цистеїнових катепсинів беруть участь у канцерогенезі і кожен фермент має свою особливу функцію в його ключових процесах – проліферації, апоптозі, неоангіогенезі чи інвазії [15, 36].

Водночас участь лізосомальних цистеїнових катепсинів в агресивній поведінці пухлин різної локалізації, гістологічної будови чи рівня диференціювання ще недостатньо вивчена. У деяких дослідженнях не фіксували збільшення вмісту цистеїнових катепсинів, проте низька експресія мРНК була зкомпенсована високою активністю ферментів, при цьому деградація їх субстратів відбувалася у 10 разів швидше [11]. Крім того, встановлено, що ступінь активації цих ферментів прямо пропорційна терапевтичному ефекту препаратів, що застосовуються при лікуванні раку [1]; проте за іншими даними саме досягнення гальмування активності катепсинів чи виключення функції генів, що їх кодують, є важливою стратегією протипухлинної терапії [22].

Результати дослідження змін функціонального стану цистеїнових катепсинів у злоякісних пухлинах щитоподібної залози (ЩЗ) не відображають цілісну картину щодо їх можливої специфічної ролі в процесах злоякісної трансформації, росту і метастазування тиреоїдних пухлин. Так, показано, що загальна активність катепсинів у тканині карцином ЩЗ підвищена у 6 разів порівняно з нормальною тканиною залози [4], збільшена вона також у тканині карцином ЩЗ шурів [33]. Зміни експресії катепсину L спостерігали за

дії чинників, що впливають на проліферацію, диференціювання і дедиференціювання клітин злоякісної пухлини ЩЗ [27]. Активність катепсину L підвищена в тканині папілярних [5] і фолікулярних [30] карцином, а катепсину В вища удвічі за фолікулярної і у 5-15 разів за папілярної карцином [29, 30]. В них також збільшена експресія катепсину В [32].

У трансформованій клітині (досліді на клітинних лініях карцином ЩЗ) змінюються шляхи внутрішньоклітинного переміщення різних форм катепсину В, що на думку авторів є важливим для виникнення і прогресування злоякісного процесу [34]. Постулюється також важлива роль ядерної локалізації катепсинів у виникненні карцином ЩЗ за рахунок або модифікації під впливом катепсину В білків, які пов'язані з ДНК [35], або модифікації під впливом катепсину L ядерного транскрипційного фактора CDP/CUX, надекспресія якого прискорює входження клітини в S-фазу [16].

Активність деяких цистеїнових катепсинів (W і X) значно вища у „післячорнобильських” карциномах ЩЗ порівняно з такою в спорадичних пухлинах. Це поряд з активацією металопротеїназ 1, 9 і 13 вважають особливістю радіоіндукованих карцином [9]. Катепсин В також включений до білків, які вважають маркерами тиреоїдної трансформації [10, 32].

Незначна частина досліджень присвячена з'ясуванню ролі цистеїнових катепсинів у інвазії та метастазуванні карцином ЩЗ. Так, повідомлено про підвищення активності катепсину В у пухлині при екстракапсулярному її розповсюдженні [21]. Механізм останнього пов'язують зі збільшенням під дією катепсину L деградації еластину [8]; вплив деяких препаратів, спрямованих на зниження рухливості тиреоїдних пухлинних клітин, також опосередкований зниженням вмісту прокатепсину L [13].

У попередніх дослідженнях ми встановили, що активність катепсинів Н, В і L у тканині папілярних карцином є збільшеною [6].

Метою цієї роботи було з'ясувати залежність цих змін у лізосомах з тканини папілярних карцином ЩЗ, які мають різні біологічні характеристики.

## МЕТОДИКА

Досліджено зразки тканини 21-ї папілярної карциноми та 9 зразків позапухлинної незміненої тканини ЩЗ нормофолікулярної будови. Вміст тиротропіну та тиреоїдних гормонів у крові пацієнтів, тканина ЩЗ яких досліджена, не виходив за межі референтних значень здорових осіб. На проведення досліджень було отримано дозвіл від Комітету з питань біоетики ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України».

Тканину ЩЗ промивали охолодженим фізіологічним розчином, зважували, подрібнювали та гомогенізували у 10-кратному об'ємі середовища такого складу (ммоль/л): цукроза – 250, тріс-НСІ-буфер – 20, ЕДТА- $\text{Na}_2$  – 1 (рН 7,4). Фракцію лізосом виділяли загальноприйнятим методом диференціального центрифугування, осад органел суспендували у середовищі виділення, яке не містило ЕДТА. Всі процедури проводили при 4 °С.

Активність катепсинів визначали за методичними принципами, які викладені в праці Barret і Kirschke [7], із субстратами – L-лейцин-4-нітроанілід (катепсин Н),  $\text{N}_2$ -бензоіл-DL-аргінін-4-нітроанілід (катепсин В) і азоказеїн, 6%-й розчин якого був денатурований 6-ти молярним розчином сечовини (катепсин L). Активність катепсинів Н і В виражали у мікромолях паранітроаніліну, який відщепився від субстрату за годину інкубації, на 1 мг білка, а катепсину L – в одиницях абсорбції низькомолекулярних пептидів, що утворилися за годину інкубації і не осаджуються трихлороцтовою кислотою, на 1 мг білка. Вміст білка у суспензії лізосом і встановлювали за однією з модифікацій методу Лоурі [17].

Одержані результати опрацьовані статистично з використанням критерію t Стью-

дента чи непараметричного критерію U Віл-коксона–Манна–Уїтні. Вірогідно значимою вважали різницю при  $P < 0,05$ . При аналізі отриманих результатів враховували висновки патолога щодо результатів дослідження післяопераційного матеріалу.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Перед викладенням та аналізом результатів досліджень зазначимо, що при розподілі зразків тканин по групах враховували лише один з показників (будова тканини, категорія пухлини TNM, наявність капсули, а також інвазії у кровоносні і лімфатичні судини, розповсюдження пухлинних клітин по залозі та за її межі у м'які тканини), розуміючи при цьому, що поряд із досліджуваною характеристикою зразки тканини мають і інші. Проте у реальних умовах неможливо скласти вибірки, в яких зразки пухлинної тканини ЩЗ у кожній з груп мали б лише одну з таких характеристик, тому, на нашу думку, подібним аналізом, незважаючи на його гетерогенність, можна все ж отримати певну інформацію.

Активність усіх досліджених катепсинів у лізосомах з тканини папілярних карцином ЩЗ збільшена. Найсуттєвіше підвищення (у 2,8 раза) спостерігали для катепсину Н ( $44,3 \pm 12,8$  мікромоль паранітроаніліну/(год•мг білка) і  $124,1 \pm 17,2$  мікромоль паранітроаніліну/(год•мг білка),  $P < 0,05$  відповідно у позапухлинній та пухлинній тканині), менше – для катепсинів В ( $21,3 \pm 3,6$  мікромоль паранітроаніліну/(год•мг білка) і  $47,5 \pm 9,3$  мікромоль паранітроаніліну/(год•мг білка),  $P < 0,05$ ) і L ( $0,66 \pm 0,09$  одиниць абсорбції/(год•мг білка) і  $1,12 \pm 0,11$  одиниць абсорбції/(год•мг білка),  $P < 0,05$ ).

Встановлено, що збільшення активності катепсину Н у лізосомах з тканини карцином не залежить від їх будови, тоді як високу активність катепсину В спостерігали в лізосомах з пухлин фолікулярно-папілярної і гетерогенної будови з наявністю солідних ділянок, а катепсину L – лише в лізосомах



з карцином фолікулярно-папілярної будови (рис. 1, а). Активність ферментів у лізосомах з пухлин категорії Т1-Т3 була суттєво вищою за норму, за винятком такої для катепсину Н у лізосомах з карцином категорії Т1, яка не відрізнялася від відповідної величини в лізосомах з незміненої тканини ЩЗ (див. рис. 1, б).

Активність усіх трьох катепсинів вища в лізосомах з тканини неінкапсульованих па-

пілярних карцином (див. рис. 1, в), в той час як при розповсюдженні пухлинних клітин по залозі, так і без такої активності ферментів у лізосомах виявилася високою (за винятком катепсину В у лізосомах з пухлин без інтра-тиреоїдної інвазії) (див. рис. 1, г). При цьому відмічено, що за умов розповсюдження пухлинних клітин по залозі активність катепсину Н у лізосомах з таких карцином суттєво вища,

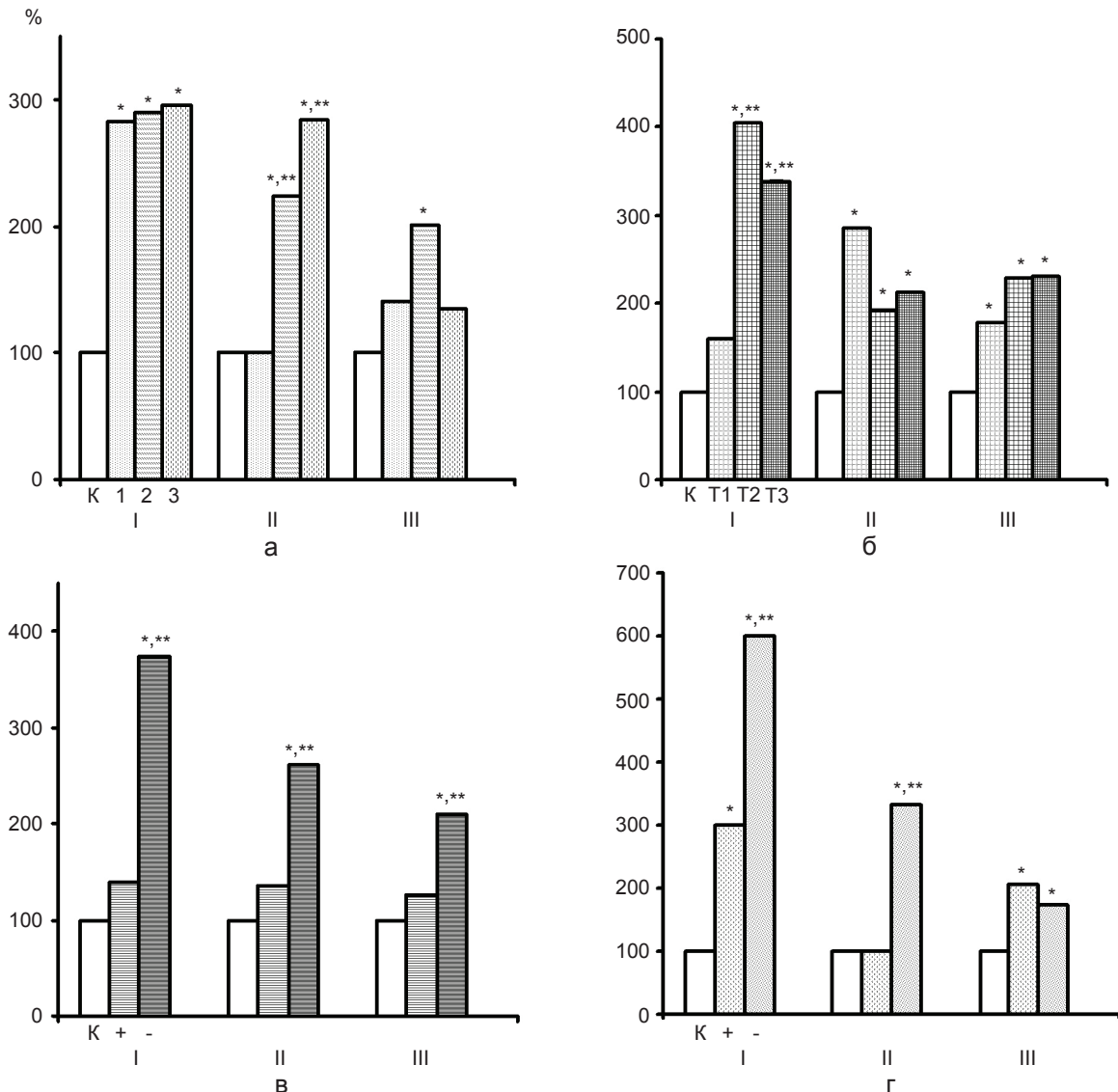


Рис. 1. Зміни активності цистеїнових катепсинів у лізосомах з папілярних карцином різної будови (а), різної категорії Т (б), за наявності капсули (в), за розповсюдження по залозі (г): I – катепсин Н, II – катепсин В, III – катепсин Л; 1 – карциноми типової папілярної будови, 2 – карциноми фолікулярно-папілярної будови, 3 – карциноми гетерогенної будови з солідними ділянками. – – ознаки немає, +- ознака є, К – контроль. \* $P < 0,05$  порівняно з контролем, \*\* $P < 0,05$  порівняно з карциномами типової папілярної будови чи карциномами категорії Т1, чи карциномами за відсутності ознаки

ніж у лізосомах з пухлин без інтратиреоїдної інвазії. Не відмічено різниці у підвищенні активності ферментів у лізосомах з пухлин за умов наявності чи відсутності кровоносної інвазії (рис. 2, а), тоді як за наявності лімфатичної інвазії зростання активність катепсину Н перевищувало таке в лізосомах з пухлин без неї, катепсину L у разі лімфатичної інвазії залишалася на рівні норми, а збільшення активності

катепсину В не залежало від цієї характеристики папілярних карцином (див. рис. 2, б).

За умов розповсюдження пухлини за межі залози у прилеглі м'які тканини активність катепсинів Н і L (але не катепсину В) у лізосомах висока і вірогідно відрізнялася від такої у лізосомах з карцином без екстратиреоїдної інвазії (див. рис. 2, в). Дещо несподівано, що активність ферментів суттєво вища в лізосомах

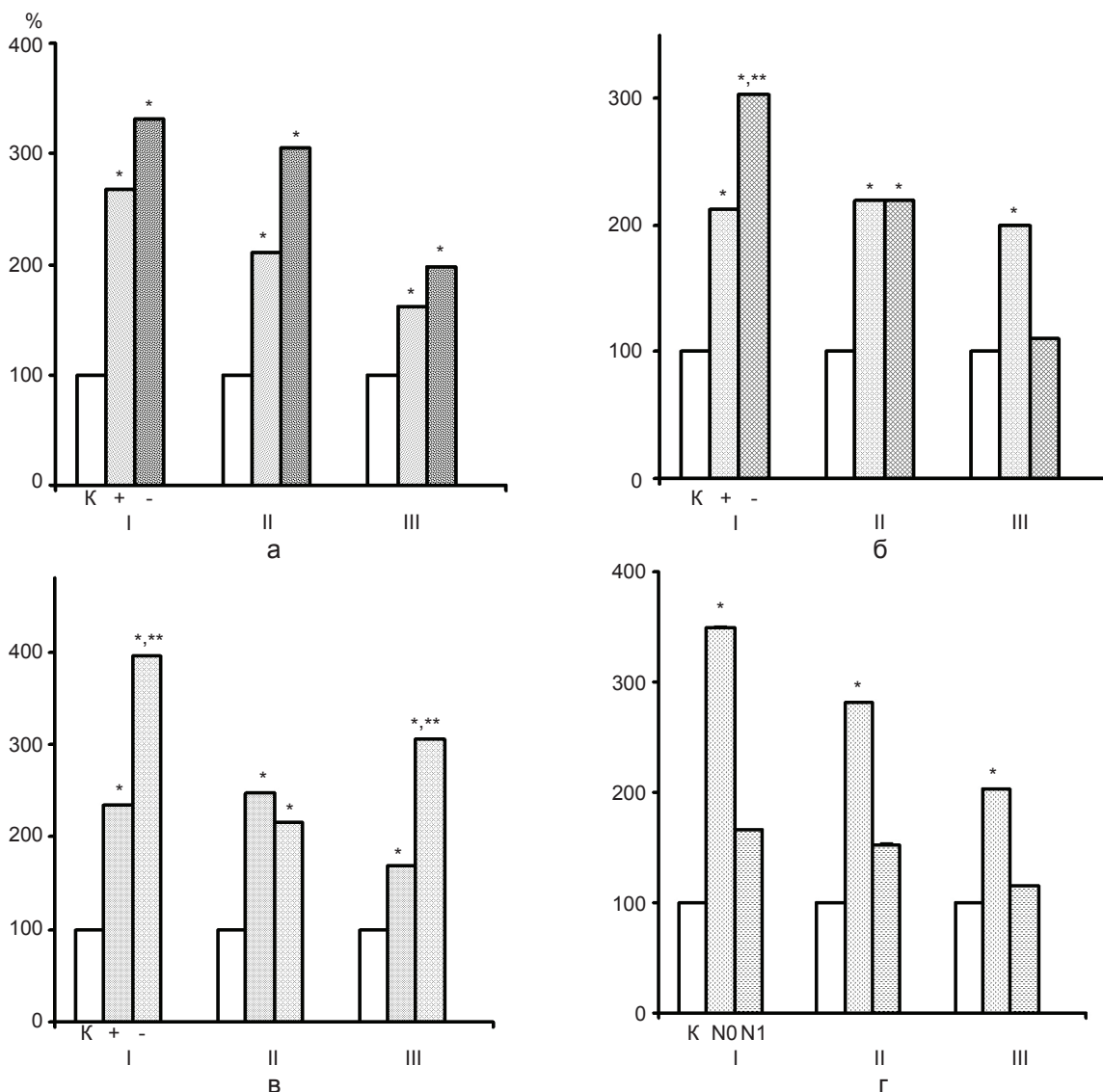


Рис. 2. Зміни активності цистеїнових катепсинів у лізосомах з папілярних карцином залежно від їх інвазійних і метастатичних властивостей: I – катепсин Н, II – катепсин В, III – катепсин L; а – інвазія до кровоносних судин, б – інвазія до лімфатичних судин, в – розповсюдження у м'які тканини, г – метастазування до лімфовузлів. – – ознаки немає, + – ознака є, К – контроль. \* $P < 0,05$  порівняно з контролем, \*\* $P < 0,05$  порівняно з карциномами за відсутності ознаки

з пухлин, які не мають метастазів до регіонарних лімфовузлів порівняно з такою не тільки в лізосомах з незміненої тканини, але і з тканини метастазуючих карцином (див. рис. 2, г).

## ОБГОВОРЕННЯ

У лізосомах, які були отримані з тканини папілярних карцином відмічена суттєва активація усіх трьох досліджених цистеїнових катепсинів. Ці результати збігаються з даними інших авторів, які засвідчили зростання активності катепсинів В і L у пухлинах ШЗ [5, 21, 29, 32]. Вважають, що окрім збільшення експресії мРНК катепсинів, одним з молекулярних механізмів активації цих ферментів, зокрема катепсину L, може бути вплив на них інсуліно-подібного пептиду, експресія якого висока у неопластичній тканині ШЗ [8].

Отримані результати підтвердили думку, що кожен з вивчених ферментів може мати індивідуальну функцію у ключових процесах пухлинного росту в ШЗ. Найсуттєвіші кількісні зміни відмічені для катепсину Н, який, за деякими даними, насамперед активується за умов інтенсифікації проліферативних процесів [2]. Так, різке підвищення активності цього ферменту відмічено у лізосомах з папілярних карцином категорії T2 і T3, за розповсюдження пухлинних клітин по залозі і за її межі у м'які тканини та у разі лімфатичної інвазії. Встановлене свідчить про інтенсифікацію функції катепсину Н у папілярних карциномах ШЗ з агресивнішою біологічною поведінкою порівняно з тими, в яких зазначені особливості відсутні чи виражені значно менше. Слід зазначити, що надекспресія катепсину Н у клітинах гепатоми асоціюється саме з її агресивним фенотипом, при цьому експресія цього катепсину регулюється тиреоїдними гормонами [37].

Спектр особливостей змін активності катепсину В у лізосомах залежно від характеристик карцином менш широкий, ніж для катепсину Н. Відмічено підвищення активності ферменту у лізосомах з пухлин

гетерогенної будови, особливо при наявності солідних ділянок порівняно з пухлинами типової папілярної структури, та карцином за їх інтратиреоїдної інвазії. Зміни активності катепсину L у лізосомах з папілярних карцином, незважаючи на її підвищення, майже не залежать від характеристик пухлин, що були проаналізовані. Лише у разі екстратиреоїдної інвазії активність ферменту в лізосомах була вірогідно вищою за таку в лізосомах з пухлин без зазначеної ознаки. Несподіваним є той факт, що активність катепсину L підвищена лише в лізосомах з карцином фолікулярно-папілярної будови і залишається в межах норми в лізосомах з пухлин типової папілярної будови, а також гетерогенної будови з наявністю солідних ділянок, тобто в пухлинах, які відрізняються ступенем диференціювання.

Загальною особливістю для вивчених ферментів є висока активність усіх катепсинів у лізосомах з тканини неінкапсульованих карцином, що безперечно свідчить про їх участь у процесах пухлинної інвазії. Проте, якщо в лізосомах з карцином за інтратиреоїдної інвазії це стосується катепсинів Н і В, то за екстратиреоїдної інвазії – катепсинів Н і L. Зазначені ферменти, певно, не беруть участі в інвазії пухлинних клітин до кровоносних і лімфатичних судин. В останньому випадку можна говорити про участь у цих процесах лише катепсину Н. Цікавим і несподіваним є той факт, що активність жодного з вивчених ферментів не підвищена в лізосомах з тканини метастатичних карцином (категорія пухлин N1). Раніше ми показали, що не має також суттєвої різниці катепсиноподібної активності в крові пацієнтів з папілярними карциномами категорії N0 і N1 [3]. Отже, ці лізосомальні катепсини, певно, не залучені до метастазування карцином до регіонарних лімфовузлів.

Таким чином, для катепсинів Н, В і L встановлена певна залежність їх активації від біологічних характеристик папілярних карцином ШЗ. Цистеїнові катепсини відіграють важливу роль у клітинному протео-

лізі в трансформованій клітині, що сприяє прогресуванню пухлинного росту в ЩЗ. При цьому особливості їх участі в процесах інвазії різні, що може бути пов'язано з біохімічними особливостями ферментів, неоднаковою їх локалізацією у лізосомальних пулах і різними клітинними та позаклітинними субстратами. Так, встановлено, що катепсини В і L локалізуються у різних лізосомальних пулах [18], що може пояснити відмінність у характері змін їх активності в папілярних карциномах з однаковим фенотипом. З'ясування специфічності участі цистеїнових катепсинів у канцерогенезі, зокрема тиреоїдному, потребує подальших досліджень.

**Е. В. Калініченко, Т. М. Мишуніна,  
Н. Д. Тронько**

#### **ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЦИСТЕИ- НОВЫХ КАТЕПСИНОВ В ЛИЗОСОМАХ ИЗ ТКАНИ ПАПИЛЛЯРНЫХ КАРЦИНОМ ЩИ- ТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С РАЗЛИЧНЫМИ БИ- ОЛОГИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ**

Для выяснения возможной роли цистеиновых катепсинов Н, В и L в протеолитических процессах, которые способствуют опухолевому росту в щитовидной железе, исследована их активность в лизосомах, выделенных из ткани папиллярных карцином. Показано, что для этих ферментов существует определенная зависимость изменений активности от ряда биологических характеристик опухолей. Так, резкое увеличение активности катепсина Н отмечено в лизосомах из ткани карцином категории Т2 и Т3, при интра- и экстра-тиреоидной, а также лимфатической инвазии опухолевых клеток; катепсина В – в лизосомах из ткани гетерогенного фолликулярного строения, особенно при наличии солидных участков, в сравнении с опухолями типичного папиллярного строения и в лизосомах из ткани карцином при интратиреоидной, а катепсина L – при экстра-тиреоидной инвазии. Общей особенностью для исследованных ферментов является повышение активности всех катепсинов в лизосомах из ткани неинкапсулированных папиллярных карцином. Указанные ферменты, наверное, не принимают участие в инвазии опухолевых клеток в кровеносные сосуды и в механизмах метастазирования опухолей в регионарные лимфатические узлы: о последнем свидетельствует отсутствие изменений активности катепсинов в лизосомах из ткани карцином категории N1. Полученные результаты указывают на разную роль катепсинов Н, В и L в тиреоидном канцерогенезе, где каждый фермент имеет свою специфическую функцию.

**Ключевые слова:** цистеиновые катепсины В, Н, L, папиллярные карциномы щитовидной железы, инвазия.

**O. V. Kalinichenko, T. M. Myshunina,  
M. D. Tron'ko**

#### **CHANGES IN ACTIVE CYSTEINE CATHEPSINS IN LYSOSOMES FROM TISSUES THYROID PAPILLARY CARCINOMAS WITH VARIOUS BIOLOGICAL CHARACTERISTICS**

To clarify possible role of cysteine cathepsin H, B and L in the proteolytic processes that contribute to the progression of tumor growth in the thyroid, we studied their activity in lysosomes isolated from the tissue of papillary carcinomas. It was shown that for these enzymes there is a dependence of the changes in their activity on a number of biological characteristics of the tumors. Thus, the sharp increase in the activity of cathepsin H observed in lysosomes of tissue carcinomas category T2 and T3, with intra- and extrathyroid and lymphatic invasion of tumor cells. An increase in the activity of cathepsin B is set in the lysosomes of tissue heterogeneous follicular structure, especially in the presence of solid areas, in comparison with typical papillary tumors and in the lysosomes of tissue carcinomas in intrathyroid and cathepsin L – at extrathyroid invasion. A common feature of the enzymes is to increase the activity of cathepsins in lysosomes of tissue non-encapsulated papillary carcinomas. These enzymes probably do not take part in the invasion of tumor cells into blood vessels and in the mechanisms of tumor metastasis to regional lymph nodes. The latter shows no changes in the activity of cathepsins in lysosomes of tissue carcinomas category N1. The results indicate the different role of cathepsin H, B and L in thyroid carcinogenesis, where each enzyme has its specific function. Key words: cysteine cathepsins B, H, L, thyroid papillary carcinoma, invasion.

*V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and  
Metabolism of AMS of Ukraine, Kyiv*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Жанаева С.Я., Дьяков А.И., Алексеев Т.А., Короленко Т.А. Прогностическая значимость цистеиновых протеаз лизосом в определении эффективности противоопухолевой терапии // Биомед. химия. – 2009. – 55, вып. 1. – С. 89–97.
2. Жлоба А.А., Дунаевский В.А. Активность секреторных форм цистеиновых катепсинов в крови в качестве маркера процессов тканевого роста // Вопросы онкологии. – 1996. – № 1. – С. 70–76.
3. Калініченко О.В., Мишуніна Т.М., Тронько М.Д. Катепсиноподібна активність у плазмі крові хворих з папілярною карциномою щитоподібної залози // Фізіол. журн. – 2010. – 56, № 6. – С. 76–81.
4. Кирпиченюк Л.Н., Гидранович Л.Г., Шиленок В.Н. Активность протеолитических процессов при забо-

- леваниях щитовидной железы // Вопросы мед. химии. – 2000. – № 5. – С. 45.
5. Лянна О.Л., Чорна В.І., Хворостенко М.І. Особливості регуляції активності цистеїнових протеаз та визначення їх клінічного значення за канцерогенезу щитоподібної залози // Укр. радіол. журн. – 2009. – № 3. – С. 308–311.
  6. Мишуніна Т.М. Чи дійсно зростання концентрації ТТГ у крові хворих з карциномою щитоподібної залози може бути наслідком підвищеної активності катепсину L ? // Ендокринологія. – 2013. – № 1. – С. 18–22.
  7. Barret A., Kirschke H. Cathepsins B, H, and L. – In: Methods in enzymology. Ed.: L. Loran. New-York, London: Acad. press. – 1981. – **80**, part C. – P 535–561.
  8. Bialek J., Hombach-Klonisch S., Fiebig B., Weber E., Hoang-Vu C., Klonisch T. Lysosomal acid hydrolases of the cathepsin family are novel targets of INSL3 in human thyroid carcinoma cells // Ann. NY Acad. Sci. – 2009. – № 1160. – P. 361–366.
  9. Boltze C., Riecke A., Ruf C., Port M., Nizze H., Kügler C., Miethke C., Wiest N., Abend M. Sporadic and radiation-associated papillary thyroid cancers can be distinguished using routine immunohistochemistry // Oncol. Rep. – 2009. – **22**, № 3. – P. 459–467.
  10. Brown L., Helmke S., Hunsucker S., Netea-Maier R., Chiang S., Heinz D., Shroyer K., Duncan M., Haugen B. Quantitative and qualitative differences in protein expression between papillary thyroid carcinoma and normal thyroid tissue // Mol. Carcinog. – 2006. – **45**, № 8. – P. 613–626.
  11. Budihna M. Prognostic value of cathepsins B, H, L, D and their endogenous inhibitors stefins A and B in head and neck carcinoma // Biol. Chem. – 1996. – **377**. – P. 385–390.
  12. Buth H., Wolters B., Hartwig B., Meier-Bornheim R., Veith H., Hansen M., Sommerhoff C., Schaschke N., Machleidt W., Fusenig N., Boukamp P., Brix K. HaCaT keratinocytes secrete lysosomal cysteine proteinases during migration // Eur. J. Cell Biol. – 2004. – **83**. – P. 781–795.
  13. Glogowska A., Pyka J., Kehlen A., Los M., Perumal P., Weber E., Cheng S., Hoang-Vu C., Klonisch T. The cytoplasmic domain of proEGF negatively regulates motility and elastinolytic activity in thyroid carcinoma cells // Neoplasia. – 2008. – **10**, № 10. – P. 1120–1130.
  14. Gocheva V., Joyce J. Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion // Cell Cycle. – 2007. – **6**, № 1. – P. 60–64.
  15. Gocheva V., Zeng W., Ke D., Klimstra D., Reinheckel T., Peters C., Hanahan D., Joyce J. Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis // Genes Dev. – 2006. – **20**, № 5. – P. 543–556.
  16. Goulet B., Sansregret L., Leduy L., Bogoy M., Weber E., Chauhan S., Nepveu A. Increased expression and activity of nuclear cathepsin L in cancer cells suggests a novel mechanism of cell transformation // Mol. Cancer Res. – 2007. – **5**, № 9. – P. 899–907.
  17. Hartree T. Determination of protein: A modification of Lowry method that gives a linear photometric response // Anal. Biochem. – 1972. – **48**, № 2. – P. 422–427.
  18. Jordans S., Jenko-Kokalj S., Kühl N., Tedelind S., Sendt W., Brömme D., Turk D., Brix K. Monitoring compartment-specific substrate cleavage by cathepsins B, K, L, and S at physiological pH and redox conditions // BMC Biochem. – 2009. – **22**, № 10. – P. 23.
  19. Koblinski J., Ahram M., Sloane B. Unraveling the role of proteases in cancer // Clin. Chim. Acta. – 2000. – **291**, № 2. – P. 113–135.
  20. Korolenko T. Cysteic proteinases lisosom and inhibitors: the role in tumor inflammation and development // Biochemistry fundamental and applied aspects: scient. conf. works. October, 15–17, 1998. – SPb., 1998. – **1**. – P. 180–187.
  21. Kusunoki T., Nishida S., Nakano T., Funasaka K., Kimoto S., Murata K., Tomura T. Study on cathepsin B activity in human thyroid tumors // Auris Nasus Larynx. – 1995. – **22**, № 1. – P. 43–48.
  22. Lankelma J., Voorend D., Barwari T., Koetsveld J., Van der Spek A., De Porto A., Van Rooijen G., Van Noorden C. Cathepsin L, target in cancer treatment? // Life Sci. – 2010. – **86**, № 7–8. – P. 225–233.
  23. Mohamed M., Sloane B. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer // Nat. Rev. Cancer. – 2006. – **6**. – P. 764–775.
  24. Moin K. Tumor cell membrane cathepsin B // Biol. Chem. – 1998. – **379**, № 8–9. – P. 1093–1099.
  25. Nomura T., Katunuma N. Involvement of cathepsins in the invasion, metastasis and proliferation of cancer cells // J. Med. Invest. – 2005. – **52**, № 1–2. – P. 1–9.
  26. Nyberg, P. Trypsins and their role in carcinoma growth // Exp. Cell Res. – 2006. – **312**, № 8. – P. 1219–1228.
  27. Plehn A., Günther D., Aurich H., Hoang-Vu C., Weber E. Influence of proliferation, differentiation and dedifferentiation factors on the expression of the lysosomal cysteine proteinase cathepsin L (CL) in thyroid cancer cell lines // Adv. Exp. Med. Biol. – 2000. – **477**. – C. 487–495.
  28. Podgorski I., Linebaugh B., Sameni M., Jedeszko C., Bhagat S., Cher M., Sloane B. Bone microenvironment modulates expression and activity of cathepsin B in prostate cancer // Neoplasia. – 2005. – **7**. – P. 207–223.
  29. Shuja S., Ca J., Iacobuzio-Donahue C., Zacks J., Beazley R., Kasznica J., O'Hara C., Heimann R., Murnane M. Cathepsin B activity and protein levels in thyroid carcinoma, Graves' disease, and multinodular goiters // Thyroid. – 1999. – **9**, № 6. – P. 569–577.
  30. Shuja S., Murnane M. Marked increases in cathepsin B and L activities distinguish papillary carcinoma of the thyroid from normal thyroid or thyroid with non-neoplastic disease // Int. J. Cancer. – 1996. – **66**, № 4. – P. 420–426.
  31. Sloane B. Membrane association of cathepsin B can be induced by transfection of human breast epithelial cells with c-Ha-ras oncogene // J. Cell Sci. – 1994. – **107**, Pt 2. – P. 373–384.
  32. Srisomsap C., Subhasitanont P., Otto A., Mueller E., Punyarit P., Wittmann-Liebold B., Svasti J. Detection



- of cathepsin B up-regulation in neoplastic thyroid tissues by proteomic analysis // *Proteomics*. – 2002. – **2**, № 6. – P. 706–712.
33. Starling J., Clifton K., Norback D. Enzymatic and ultrastructural study of lysosomes in rats bearing radiation-induced thyroid follicular carcinoma // *J. Surg. Oncol.* – 1981. – **16**, № 1. – P. 15–25.
  34. Tedelind S., Jordans S., Resemann H., Blum G., Bogoy M., Führer D., Brix K. Cathepsin B trafficking in thyroid carcinoma cells // *Thyroid Res.* – 2011. – **4**, Suppl. 1. – P. S2.
  35. Tedelind S., Poliakova K., Valeta A., Hunegnaw R., Yemanaberhan E., Heldin N., Kurebayashi J., Weber E., Kopitar-Jerala N., Turk B., Bogoy M., Brix K. Nuclear cysteine cathepsin variants in thyroid carcinoma cells // *Biol. Chem.* – 2010. – **391**, № 8. – P. 923–935.
  36. Vasiljeva O., Papazoglou A., Kruger A., Brodoefel H., Korovin M., Deussing J., Augustin N., Nielsen B., Almholt K., Bogoy M., Peters C., Reinheckel T. Tumor cell-derived and macrophage-derived cathepsin B promotes progression and lung metastasis of mammary cancer // *Cancer Res.* – 2006. – **66**. – P. 5242–5250.
  37. Wu S., Huang Y., Yeh C., Tsai M., Liao C., Cheng W., Chen W., Lin K. Cathepsin H regulated by the thyroid hormone receptors associate with tumor invasion in human hepatoma cells // *Oncogene*. – 2011. – **30**, № 17. – P. 2057–2069.

ДУ “Інститут ендокринології та обміну речовин  
ім. В.П. Комісаренка НАМН України”, Київ  
E-mail: mishunina@list.ru

Матеріал надійшов  
до редакції 11.03.2013

Н.Д. Носенко, А.А. Лимарєва

## Особливості статевої поведінки самиць щурів за умов гіперандрогенії в пубертатний та постпубертатний періоди

*Досліджено жіночу та чоловічу статеву поведінку самиць щурів віком 3 та 6 міс, які були піддані дії надлишку андрогенів (підшкірна імплантація силастикових капсул, що містили 5 мг кристалічного тестостерону) на початку пубертатного періоду (у віці 35 діб) або в постпубертатний період (у віці 4 міс). Гіперандрогенія в пубертатному періоді не мала негативних наслідків для формування жіночої статевої поведінки, водночас викликала появу компонентів чоловічої поведінки (садок) у 100 % тварин. У самиць щурів, котрим імплантували капсули з тестостероном у постпубертатному періоді, порушення статевої поведінки були більш вираженими і характеризувалися маскулінізацією та дефемінізацією, що пов'язано з більшою андрогенною насиченістю організму. Отримані результати вказують на провідну роль гіперандрогенії в патогенезі порушень статевої поведінки самиць щурів у різні періоди індивідуального розвитку організму.*

*Ключові слова:* статеву поведінку, гіперандрогенія, пубертатний і постпубертатний періоди, самиці щурів.

### ВСТУП

Гормони, в залежності від їх вмісту в жіночому організмі, можуть відігравати роль фізіологічного регулятора репродуктивних функцій або чинника, що зумовлює їх порушення. Серед останніх особливо небезпечні для формування жіночої репродуктивної системи андрогенні стероїди. Вони не тільки програмують в ранньому онтогенезі патологічні зміни в нейроендокринній регуляції секреції гонадотропних гормонів і статевій поведінці [2], але й здатні викликати різноманітні розлади репродуктивної функції за умов їх надмірної секреції під час статевого дозрівання або в період статевої зрілості [5, 6]. Найбільш досліджено феноменологію порушень статевої поведінки самиць щурів, зумовлених дисбалансом андрогенів у пре- та ранньому постнатальному періодах індивідуального розвитку організму [8, 9]. Значно менше відомо про особливості формування

статевої поведінки у самиць щурів за умов гіперандрогенії в більш віддалені періоди життя.

Метою роботи було вивчення та порівняння основних показників статевої поведінки за жіночим і чоловічим типами у самиць щурів, які зазнавали дії надлишку андрогенів у пубертатний та постпубертатний періоди.

### МЕТОДИКА

Досліди проведено на 23 щурах-самицях лінії Вістар з дотриманням вимог Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей. Тварин утримували на звичайному раціоні в стандартних умовах віварію.

Моделювання гіперандрогенного стану у самиць щурів здійснювали за допомогою імплантації силастикових капсул, що містили 5 мг кристалічного тестостерону ("Fluka",

Нідерланди). Детально методика описана нами раніше [4]. Імплантацію капсул з тестостероном проводили тваринам у віці 35 діб (І серія) або 4 міс (ІІ серія). Через 3 тиж після імплантації капсул вивчали фазову структуру естральних циклів, щоденно проводили цитологічний аналіз вагінальних мазків за допомогою світлової мікроскопії. Статеву поведінку досліджували у самиць щурів віком 3 (І серія,  $n=13$ ) або 6 міс (ІІ серія,  $n=10$ ). У дослідах використовували лише тварин з порушеними естральними циклами. Контрольні групи формували з інтактних самиць того ж самого віку згідно з серією експерименту.

Статеву поведінку самиць за жіночим та чоловічим типом вивчали за загальноприйнятою методикою [10]. Дослідження статевої поведінки за жіночим типом проводили на самицях після оварієктомії, у яких викликали еструс введенням естрадіолу бензоату (0,1 мг на тварину внутрішньом'язово) за 48 год та прогестерону (0,5 мг на тварину внутрішньом'язово) за 4–5 год до тестування. До початку тестування тварини перебували в темній кімнаті при слабкому червоному світлі не менше 4–5 год. Самця поміщали в клітку за 5 хв до тестування для його адаптації до умов дослідження. До кожного самця підсаджували самицю, яка знаходилася в клітці впродовж 10 хв або до 10 садок самця. Реєстрували ознаки процептивної поведінки (наближення, обнюхування статевих органів, підсакування, покусування вух) і рецептивну поведінку (кількість лордозних реакцій). Обчислювали лордозний коефіцієнт, тобто відсоток лордозних реакцій відносно загальної кількості садок самця.

Для тестування статевої поведінки за чоловічим типом до дослідної самиці підсаджували на 10 хв рецептивно активну інтактну самицю в стадії еструсу. Спостерігали за наближенням тварини до рецептивної самиці, обнюхування нею статевих органів (чоловіча процептивна поведінка), а також реєстрували кількість садок (чоловіча копулятивна поведінка).

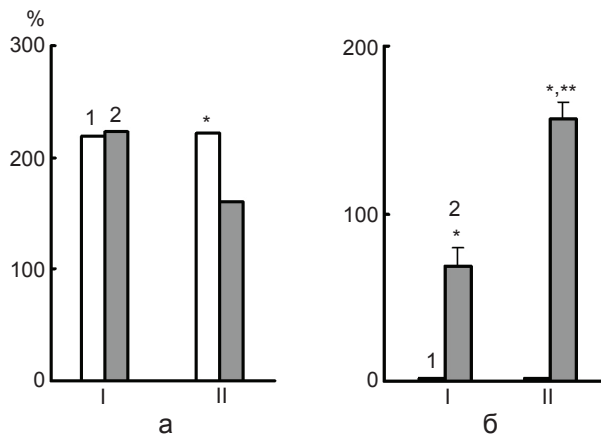
Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію  $t$  Стьюдента і непараметричного критерію  $U$  Вілкоксона–Манна–Уїтні.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Гіперандрогенний стан у щурів з імплантованими капсулами з тестостероном було підтверджено нами раніше результатами вимірювання вмісту гормону в плазмі крові [1, 3]. У переважної більшості тварин з експериментальною гіперандрогенією спостерігалися порушення статевої циклічності, які залежно від терміну імплантації капсул з тестостероном у пубертатний або постпубертатний період характеризувалися нерегулярними естральними циклами із подовженою стадією дієструсу (у 66,7 % самиць) або їх повним перериванням і розвитком персистентного дієструсу (у 64,3 % самиць) відповідно.

Дослідження статевої поведінки показало, що у самиць щурів віком 3 міс з нерегулярними естральними циклами, які зазнавали дії надлишку андрогенів на початку пубертатного періоду (І серія експериментів), значення показників тестування статевої поведінки за жіночим типом практично не змінювалися. Всі вони демонстрували активну процептивну і рецептивну поведінку. Кількість лордозних реакцій і лордозний коефіцієнт – основні показники рецептивної поведінки самиць, не відрізнялися від контролю (таблиця, рис. а, І). Водночас у дослідних тварин з'являлися ознаки чоловічої статевої поведінки, а саме – садки, які характерні для самців і повністю відсутні у нормальних самиць (див. рис. б, І). Спостерігалась активація чоловічої процептивної поведінки: кількість наближень до рецептивної самиці збільшувалась в 2,4 раза порівняно з контролем (див. табл.). Все це вказує на маскулінізуювальний ефект гіперандрогенії в пубертатний період.

Більш виражений ефект щодо порушень статевої поведінки самиць щурів продемонстровано при дії надлишку андрогенів в



Вплив гіперандрогенії в пубертатний (I) та постпубертатний (II) періоди на лордозний коефіцієнт (а) та кількість садок (б) у самиць щурів: 1 – інтактні самиці, 2 – самиці з імплантованими капсулами з тестостероном; \* $P < 0,05$  – порівняно з інтактними самицями відповідної групи; \*\* $P < 0,05$  порівняно з самицями з імплантованими капсулами з тестостероном у пубертатний період

постпубертатний період. У тварин віком 6 міс, які перебували в стадії персистентного дієструсу (II серія експериментів), вірогідно послаблювалася жіноча статевая поведінка. Кількість лордозних реакцій у цих самиць вірогідно зменшувалась у 3, 8 разів, а лордозний коефіцієнт – на 30,8 % у порівнянні з тваринами контрольної групи (див. табл., рис. а, II). Крім того, на 20 % зменшувалася кількість самиць з ознаками рецептивної поведінки.

Зміни статевої поведінки за чоловічим типом у самиць цієї дослідної групи були однаковими з такими у тварин за умов гіперандрогенії у пубертатний період, при цьому

ступінь їх прояву був виразнішим, про що свідчить збільшення у 2,3 рази кількості садок (див. рис. б, II). Дослідні самиці характеризувалися надзвичайно активною процептивною поведінкою: кількість наближень до рецептивної самиці зростала у 3,1 рази порівняно з контролем (див. табл.). Отже, гіперандрогенія у статевозрілих самиць спричиняла як маскулінізацію, так і дефемінізацію статевої поведінки.

Відомо, що процеси, які залучені в реалізацію дії андрогенів, а саме посилення чоловічої статевої поведінки, блокада циклічної секреції гонадотропінів та пригнічення жіночої статевої поведінки, відрізняються

**Таблиця. Показники статевої поведінки самиць щурів за умов гіперандрогенії в пубертатний і постпубертатний періоди**

Показник	3 міс		6 міс	
	Інтактні самиці	Самиці з імплантованими капсулами з тестостероном у пубертатний період	Інтактні самиці	Самиці з імплантованими капсулами з тестостероном у постпубертатний період
За жіночим типом				
Кількість лордозних реакцій	$10,3 \pm 0,3$	$9,4 \pm 1,0$	$8,4 \pm 0,5$	$2,2 \pm 0,7^{*, **}$
За чоловічим типом				
Кількість наближень до самиці	$9,0 \pm 0,8$	$22,0 \pm 1,4^*$	$4,2 \pm 0,5^{\#}$	$13,0 \pm 0,7^{*, **}$

\* $P < 0,05$  – достовірна відмінність від інтактних самиць відповідної групи; \*\* $P < 0,05$  – достовірна відмінність від самиць з імплантованими капсулами з тестостероном у пубертатний період.

за своєю локалізацією та чутливістю до гормону [8, 11]. Отже, можна припустити, що порушення статевої поведінки у самиць щурів з експериментальною гіперандрогенією можуть бути наслідком, з одного боку, гальмівного (дефемінізуючого) впливу надлишку андрогенів на центри регуляції жіночої статевої поведінки, які розташовані у вентромедіальних ядрах медіобазального гіпоталамуса [7], а з іншого – їх активуючої (маскулінізуючої) дії на центри регуляції чоловічої статевої поведінки, що локалізовані в преоптичній ділянці гіпоталамуса [12].

Порівнюючи ефекти гіперандрогенії самиць щурів у пубертатний (маскулінізація статевої поведінки, яка не супроводжувалася дефемінізацією) та постпубертатний (маскулінізація і дефемінізація статевої поведінки) періоди, а також беручи до уваги дані щодо змін вмісту тестостерону в плазмі крові, стає очевидним, що ступінь порушення статевої поведінки у цих тварин залежить від рівня андрогенної насиченості організму, який, як показали наші попередні дослідження, значно вищий у самиць, що зазнавали вплив надлишку андрогенів у статевозрілому віці [1,3]. Таким чином, результати досліджень свідчать про провідну роль гіперандрогенії в патогенезі порушень статевої поведінки самиць щурів у різні періоди індивідуального розвитку організму, що може мати певне значення для пошуку і розробки засобів запобігання та корекції цих розладів.

**Н.Д. Носенко, А.А. Лимарева**

### **ОСОБЕННОСТИ ПОЛОВОГО ПОВЕДЕНИЯ САМОК КРЫС ПРИ ГИПЕРАНДРОГЕНИИ В ПУБЕРТАТНЫЙ И ПОСТПУБЕРТАТНЫЙ ПЕРИОДЫ**

Изучено женское и мужское половое поведение самок крыс в возрасте 3 и 6 мес, которые подвергались воздействию избытка андрогенов (подкожная имплантация силастиковых капсул, содержащих 5 мг кристаллического тестостерона) с начала пубертатного периода (в возрасте 35 сут) или в постпубертатный период (в возрасте 4 мес). Гиперандрогения в пубертатном периоде не влияла на формирование женского полового поведения, одновременно

вызывала появление компонентов мужского поведения (садок) в 100 % животных. У самок крыс, которым имплантировали капсулы с тестостероном в половозрелом возрасте, нарушения полового поведения были более выраженными и характеризовались маскулинизацией и дефеминизацией, что связано с большей андрогенной насыщенностью организма. Полученные результаты указывают на ведущую роль гиперандрогении в патогенезе нарушений полового поведения у самок крыс в различные периоды индивидуального развития организма. Ключевые слова: половое поведение, гиперандрогения, пубертатный и постпубертатный периоды, самки крыс.

**N.D. Nosenko, A.A. Lymareva**

### **PECULIARITIES OF SEXUAL BEHAVIOR OF FEMALE RATS WITH HYPERANDROGENIA IN PUBERTAL AND POSTPUBERTAL PERIODS**

The parameters of female and male sexual behavior in 3- and 6- month old female rats which were exposed to an androgen excess (subcutaneous implantation of Silastic capsules containing 5 mg of crystalline testosterone) from the beginning of pubertal period (at the age of 35 days), or within postpubertal period (at the age of 4 months). Hyperandrogenia in pubertal period had no effect on female sexual behavior formation, but it led to appearance of male behavior components in 100 % of animals. In female rats which were implanted with testosterone capsules in postpubertal period, sexual disturbances were more pronounced and were characterized by masculinization and defeminization, which was due to a higher degree of androgenic saturation. The data obtained suggest a leading role of hyperandrogenemia in the pathogenesis of sexual behavior disturbances in female rats in different periods of individual development.

Key words: sexual behavior, hyperandrogenia, pubertal and postpubertal period, female rats.

*State Institution "V.P. Kommissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Носенко Н.Д., Ганжий І.Ю., Сініцин П.В., Полякова Л.І., Тарасенко Л.В., Лимарева А.А., Чайковська Л.В., Сачинська О.В., Резніков О.Г. Вплив хронічного стресу під час пубертації на репродуктивну систему самиць щурів з експериментальною гіперандрогенією // *Фізіол. журн.* – 2011. – **57**, № 2. – С. 27–34.
2. Резніков О.Г. Механізми розвитку функціональної патології репродукції та адаптації в ранньому онтогенезі // *Журн. АМН України.* – 1998. – № 2. – С. 216–233.
3. Резников А.Г., Носенко Н.Д., Борис Е.Н., Полякова Л.И., Сеницын П.В., Тарасенко Л.В. Изучение эффективности гонадотропных индукторов овуляции у крыс с гиперандрогенией в условиях применения



- флутамида // Пробл. эндокринологии. – 2011. – 57, № 4. – С. 28–31.
4. Резніков О.Г., Сініцин П.В., Тарасенко Л.В., Полякова Л.І. Нейроендокринні механізми розвитку ановуляторного синдрому гіперандрогенного походження у щурів // Фізіол. журн. – 1995. – **41**, №5-6. – С. 33–37.
  5. Чернуха Г.Е. Современные представления о синдроме поликистозных яичников // Гинекол. эндокринология. – 2002. – **4**, № 8. – С. 24–27.
  6. Уитлоу Дж. Когда особенно не вовремя – синдром поликистоза яичников у подростков // Новая медицина тысячелетия. – 2008. – № 6. – С. 7–9.
  7. Dorner G., Docke F., Moustafa S. Differential localization of a male and a female hypothalamic mating center // J. Reprod. Fert. – 1986. – **17**. – P. 582–586.
  8. Foecking E.M., McDevitt M.A., Acosta-Marthnez M., Horton T.H., Levine J.E. Neuroendocrine cosequences of androgen excess in female rodents // Horm.Behav. – 2008. – **53**, № 5. – P. 673–692.
  9. Hoepfner B.A., Ward I.L. Prenatal and neonatal androgen exposure interact to affect sexual differentiation in female rats // Behav. Neurosci. – 1988. – **102**. – P. 61–65.
  10. Rodríguez-Medina M., Canchola E., Vergara-Onofre M., Rosado A. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin system: Participation on sexual hypothalamic differentiation // Pharmacol. Biochem. Behav. – 1993. – **46**. – P. 697–702.
  11. Schwarz J.M., McCarthy M.M. Cellular mechanisms of estradiol-mediated masculinization of the brain // J. Steroid Biochem.Molec.Biol – 2008. – **109**, № 3-5. – P. 300–306.
  12. Schwarz J.M., McCarthy M.M. The role of neonatal NMDA receptor activation in defeminization and masculinization of sex behavior in the rat // Horm. Behav. – 2008. – **54**, № 5. – P. 662–668.

*ДУ “Ін-т ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Косісаренка НАМН України”, Київ*  
*E-mail: reprod@i.com.ua*

*Матеріал надійшов до редакції 04.05.2013*

І.В. Головченко, М.І. Гайдай

## Церебральна гемодинаміка дітей від 8 до 12 років з порушенням рухової активності центрального походження

*У дітей з порушенням рухової активності спостерігається недостатність кровопостачання головного мозку, найбільш виражена у системі хребетних артерій правої гемісфери та низька об'ємна швидкість кровотоку як в системі внутрішніх сонних артерій, так і у хребетних. Можна зробити висновок про порушення венозного відтоку з порожнини черепа у дітей основної групи, що супроводжується порушенням венозної циркуляції в синусах мозку. За результатами реографічного дослідження встановлено, що в системі хребетних артерій спостерігається міжпівкулева асиметрія зростання в правій гемісфері, на відміну від лівої гемісфери, показників тону судин артеріального та венозного типу дрібного калібру. Діти з порушенням рухової активності мають вищі значення показників венозного відтоку, ніж у контролі, і їм властивий крацій венозний відтік із каротидної системи та децю гірший із вертебрально-базиллярної.*

*Ключові слова:* церебральна гемодинаміка, кровонаповнення артеріального русла, порушення рухової активності.

### ВСТУП

Одним з найбільш поширених у світі порушень рухової активності центрального походження, що виявляється на ранніх етапах онтогенезу людини, є дитячий церебральний параліч (ДЦП) [12, 18], який досліджували у морфологічному [16], біохімічному [11], біомеханічному [3], нейропсихологічному [1] аспектах. Нейрофізіологічними дослідженнями доведено, що важлива роль у механізмах розвитку ДЦП належить дисфункціям неспецифічних структур головного мозку, що інтегрують складні регуляторні та адаптаційно-компенсаторні процеси в організмі в цілому [8, 9, 20]. З іншого боку, зниження рівня рухової активності, призводить до зменшення притоку пропріоцептивної аферентації до головного мозку, що має велике значення у його розвитку на ранніх етапах онтогенезу [4, 6, 8]. У зв'язку з цим доцільним є з'ясування закономірностей становлення структурно-

функціональної організації головного мозку у дітей з рано набутими порушеннями рухової активності центрального походження.

Відомо, що мозковий кровообіг має аутономну регуляцію та характеризується специфічними особливостями, які зумовлені складною структурною і функціональною організацією. Основною величиною, яка характеризує інтенсивність кровообігу мозку, є об'ємна швидкість кровотоку. Таким чином, майже 15 % хвилинного об'єму в спокої припадає на частку головного мозку, маса якого становить 2 % від маси тіла. Для адекватного кровопостачання мозку характерний тісний взаємозв'язок стану регіонарного кровообігу і функціональної активності головного мозку, тобто метаболічної активністю. Посилення кровообігу в одних частинах мозку супроводжується зменшенням кровопостачання інших ділянок, які знаходяться в стані функціонального спокою [15]. Розподіл кровотоку у корі головного мозку залежить

від нейродинамічних процесів, оскільки ріст функціональної активності нервової тканини вимагає збільшення притоку крові. Отже, за характером розподілу кровопостачання в кіркових структурах можна судити про особливості діяльності мозку [2, 17].

Церебральна гемодинаміка реагує на незначні зміни активності головного мозку, забезпечуючи збереження ієрархії рівнів управління фізіологічними функціями в організмі [10, 13]. Аналіз праць, присвячених вивченню церебральної гемодинаміки у дітей з порушенням рухової активності, свідчить про наявність у них асиметрії кровонаповнення, підвищення тону артерій та вен великого й середнього калібру або значне зниження тону вен після їх тривалої гіпертензії, деформацій (перегинів) внутрішніх сонних і хребетних артерій [7]; зниження артеріального кровонаповнення магістральних артерій, порушення артеріо-венозної рівноваги [14]; зміна венозного відтоку, що супроводжується порушенням венозної циркуляції в синусах мозку [5]. Ми вважаємо, що спастичні стани внаслідок порушення іннервації м'язів при ДЦП можуть ускладнювати церебральний кровотік, створюючи невідповідність між метаболічними потребами структур головного мозку та рівнем кровопостачання.

У знайдених роботах з вивчення кровообігу головного мозку при порушеннях рухової активності центрального походження брали участь переважно діти раннього і першого дитинства та підлітки. Водночас період другого дитинства у розвитку головного мозку характеризується удосконаленням локальної ансамблевої організації у всіх ділянках кори, особливо в передніх асоціативних відділах; розвитком внутрішньокіркових горизонтальних зв'язків і зв'язків кори і глибинних структур, що забезпечує вдосконалення кіркового контролю синхронізуючих і десинхронізуючих неспецифічних впливів і є сприятливим для становлення адаптаційно-компенсаторних механізмів організму під впливом реабілітаційно-оздоровчих про-

грам. Зазначене спонукало нас до вивчення кровообігу головного мозку дітей від 8 до 12 років з порушеннями рухової активності центрального походження, що і стало метою нашої роботи.

## МЕТОДИКА

Дослідження проводили на базі Херсонського державного університету та Херсонської міської клінічної лікарні ім. О.С. Лучарського. Дітей віком від 8 до 12 років обох статей було розділено на дві групи: з порушенням рухової активності (основна) і без порушень (контрольна). Основна група складалася з 78 дітей (з них 38 дівчаток та 40 хлопчиків зі спастичною формою ДЦП.). Вони навчались у Цюрупинському будинку-інтернаті для дітей-інвалідів Херсонської області та були здатні до самостійного самообслуговування. Контрольну групу склали 100 учнів Херсонської багатопрофільної гімназії № 20 ім. Б. Лавренюва (з них 50 хлопчиків та 50 дівчаток). Усі обстеження проводили за письмової згоди батьків та з дотриманням біотичних норм (протокол біотичної експертизи № 3 від 15 листопада 2010 р.).

Дослідження церебральної гемодинаміки здійснювали за допомогою автоматизованої системи реограф Р4-О2, який з'єднаний з ІВМ-сумісним комп'ютером через послідовний порт. Для вивчення гемодинаміки мозку застосовували фронто- та окципіто-мастоїдальне відведення. Розраховували такі параметри: кровонаповнення артеріального русла, периферичний опір, дикротичний індекс, діастолічний індекс, венозний відтік, об'ємну швидкість кровотоку.

Для первинної обробки результатів використовували обчислення середнього арифметичного значення ( $M$ ) і похибки середнього ( $\pm m$ ). Для порівняння показників контрольної та основної груп використовували непараметричний двовибірковий критерій Вілкоксона, у разі нормального розподілу – двовибірковий критерій  $t$  Стюдента. Різницю між двома

середніми величинами вважали достовірною при значеннях  $P \leq 0,05$ . Аналіз кореляційних зв'язків передбачав визначення коефіцієнтів кореляцій ( $r$ ) і частки значимих і високих кореляцій досліджуваних показників у сумі всіх можливих (у відсотках). Статистичний аналіз проводили у програмних пакетах Microsoft Excel 2003 та Statistica 6.0.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Виявлено, що кровонаповнення артеріально-го русла у дітей основної групи достовірно нижче, ніж у контрольній групі в усіх із реоенцефалографічних відведень (табл. 1, 2). Дівчатка мали у середньому менше кровонаповнення артеріального русла ( $P < 0,01$ ) у правій гемісфері каротидної та в обох гемісферах вертебрально-базиллярної системи, а хлопчики як у каротидній, так і в вертебрально-базиллярній системі ( $P < 0,01$ ).

З'ясовано ( $P < 0,01$ ), що у хлопчиків з порушенням рухової активності амплітуда РЕГ

нижча, ніж у дівчаток, у лівій гемісфері каротидної системи, а в правій гемісфері вертебрально-базиллярної системи, навпаки, вища у хлопчиків. У дітей з порушенням рухової активності спостерігається недостатність кровопостачання головного мозку, найбільш виражена у системі хребетних артерій правої гемісфери.

Діти з порушенням рухової активності мають нижчу об'ємну швидкість кровотоку як у системі внутрішніх сонних артерій, так і у системі хребетних артерій, ніж їх однолітки із контрольної групи. Можна зробити висновок про зміну венозного відтоку з порожнини черепа у дітей основної групи, що супроводжується порушенням венозної циркуляції в синусах мозку.

Периферичний опір судин головного мозку у дівчаток з порушенням рухової активності вищий в правій гемісфері каротидної системи, ніж у контролі, а у хлопчиків нищий як у правій, так і в лівій гемісфері вертебрально-базиллярної системи.

**Таблиця 1. Показники церебральної гемодинаміки хлопчиків від 8 до 12 років ( $M \pm m$ )**

Показники	Хлопчики основної групи		Хлопчики контрольної групи	
	Права гемісфера	Ліва гемісфера	Права гемісфера	Ліва гемісфера
Фронтотастодальне відведення				
Периферичний опір, %	84,8 $\pm$ 3,6	85,4 $\pm$ 4,2	88,6 $\pm$ 3,1	89,9 $\pm$ 3,8
Дикротичний індекс, %	75,6 $\pm$ 3,1	78,1 $\pm$ 4,2	79,7 $\pm$ 2,9	81,2 $\pm$ 3,9
Діастолічний індекс, %	88,5 $\pm$ 3,8*	86,4 $\pm$ 4,3	84,5 $\pm$ 3,1	86,1 $\pm$ 3,8
Венозний відтік, %	21,04 $\pm$ 2,8***	19,7 $\pm$ 1,9***	13,5 $\pm$ 1,3	7,6 $\pm$ 0,7
Кровонаповнення артеріального русла, Ом/с	0,12 $\pm$ 0,01***	0,14 $\pm$ 0,01***	0,22 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,02
Об'ємна швидкість кровотоку, Ом/с	0,2 $\pm$ 0,02***	0,2 $\pm$ 0,01***	0,49 $\pm$ 0,01	0,47 $\pm$ 0,02
Окципітотастодальне відведення				
Периферичний опір, %	85,6 $\pm$ 2,3***	89,5 $\pm$ 3,6*	96,4 $\pm$ 2,2	99,4 $\pm$ 2,2
Дикротичний індекс, %	75,7 $\pm$ 2,3*	82,3 $\pm$ 4,5*	83,3 $\pm$ 2,9	71,5 $\pm$ 3,5
Діастолічний індекс, %	87,8 $\pm$ 2,9	93,1 $\pm$ 4,8	92,8 $\pm$ 1,9	94,1 $\pm$ 3,6
Венозний відтік, %	23,7 $\pm$ 3,1***	26,7 $\pm$ 2,9***	11,9 $\pm$ 1,1	15,4 $\pm$ 1,4
Кровонаповнення артеріального русла, Ом/с	0,09 $\pm$ 0,01***	0,1 $\pm$ 0,003***	0,2 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,01
Об'ємна швидкість кровотоку, Ом/с	0,2 $\pm$ 0,01***	0,2 $\pm$ 0,01***	0,6 $\pm$ 0,02	0,6 $\pm$ 0,02

Примітка. Тут і в табл. 2 \* – вірогідність різниці при порівнянні показників хлопчиків різних груп; Вірогідність різниці між групами при \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .

Таблиця 2. Показники церебральної гемодинаміки дівчаток від 8 до 12 років ( $M \pm m$ )

Показники	Дівчатка з порушенням рухової активності		Дівчатка контрольної групи	
	Права гемісфера	Ліва гемісфера	Права гемісфера	Ліва гемісфера
Фронтотомастоїдальне відведення				
Периферичний опір, %	96,8±2,2***	82,4±1,6	87,5±1,7	86,4±1,3
Дикротичний індекс, %	86,04±1,7***	70,4±1,5**	75,3±1,02	76,2±1,02
Діастолічний індекс, %	90,2±1,6**	71,7±1,4***	82,6±1,9	82,1±1,7
Венозний відтік, %	21,8±2,5***	17,5±2,2**	11,7±1,1	10,2±0,4
Кровонаповнення артеріального русла, Ом/с	0,11±0,004***	0,22±0,01	0,20±0,02	0,19±0,01
Об'ємна швидкість кровотоку, Ом/с	0,3±0,02***	0,5±0,1	0,46±0,01	0,45±0,1
Окципітотомастоїдальне відведення				
Периферичний опір, %	64,1±2,9***	75,4±5,4	85,8±1,4	80,5±4,6
Дикротичний індекс, %	51,4±3,8***	67,8±6,4	71,5±1,4	71,04±3,7
Діастолічний індекс, %	79,2±4,2	82,4±4,1•	83,9±3,5	74,5±2,6
Венозний відтік, %	18,2±2,2**	25,1±2,8***	10,9±0,8	12,6±0,9
Кровонаповнення артеріального русла, Ом/с	0,06±0,002***	0,1±0,003***	0,2±0,02	0,2±0,01
Об'ємна швидкість кровотоку, Ом/с	0,1±0,004***	0,2±0,01***	0,6±0,02	0,6±0,06

Виявлено, що тонус судин артеріального типу дрібного калібру більший у дітей контрольної групи, ніж в основній в правій гемісфері вертебрально-базиллярної системи ( $P<0,001$ ). У дівчаток з порушенням рухової активності цей показник більший у правій гемісфері каротидної системи, а у хлопчиків в лівій гемісфері вертебрально-базиллярної системи. Тонус судин артеріального типу дрібного калібру у хлопчиків нижче, ніж у дівчаток у правій гемісфері каротидної системи ( $P<0,01$ ), на відміну від цього показника в правій гемісфері вертебрально-базиллярної системи, де він більший у хлопчиків, ніж у дівчаток основної групи ( $P<0,001$ ). Низькі значення тону судин артеріального типу дрібного калібру в лівій гемісфері каротидної та в правій гемісфері вертебрально-базиллярної системи ми пояснюємо міжпівкульною та внутрішньопівкульною асиметрією та компенсаторно-приспосувальною реакцією.

Значення тону судин венозного типу дрібного калібру в правій гемісфері каротидної системи більше у дітей з порушенням рухової активності, ніж у контрольній групі. У основній групі існують статеві відмінності у середньостатистичних значеннях досліджуваного показника. Значення тону судин венозного типу дрібного калібру у хлопчиків статистично вище, ніж у дівчаток у лівій гемісфері каротидної та обох гемісфер вертебрально-базиллярної системи ( $P<0,01$ ).

Встановлено, що в системі хребетних артерій спостерігається міжпівкулева асиметрія, на це вказують високі значення тону судин артеріального та венозного типу дрібного калібру в правій гемісфері, на відміну від лівої. Ми вважаємо, що саме ця зона головного мозку уражена найбільше.

Діти з порушенням рухової активності мають вищі значення показників венозного відтоку, ніж дівчатка і хлопчики контроль-



ної групи, і їм властивий кращий венозний відтік із каротидної системи та дещо гірший із вертебрально-базиллярної. Ймовірно, що ускладнення венозного відтоку призводять до прогресуючого зниження кровонаповнення головного мозку. У дітей з порушенням рухової активності венозний застій спричинює підвищення тону вен дрібного калібру, потім, як компенсаторний механізм, у процес включаються механізми обмеження артеріального кровопостачання, а саме – спазми та гіпертонус церебральних артерій. Дисбаланс артеріо-венозного кровообігу призводить до порушення мікроциркуляції, що викликає явища застійної гіпоксії, зниження споживання кисню нейронними структурами та порушення метаболізму мозку.

Таким чином, отримані результати свідчать про певні ускладнення кровопостачання вертебрально-базиллярної системи дітей з порушенням рухової активності.

З'ясовано, що мозковий кровообіг дітей від 8 до 12 років з порушенням рухової активності характеризується зниженням артеріального кровонаповнення та об'ємної швидкості кровотоку на фоні утруднення венозного відтоку. Виявлені статеві відмінності гемодинаміки головного мозку як у дітей з порушенням рухової активності, так і школярів контрольної групи. Утруднений венозний відтік як в каротидній, так і вертебрально-базиллярній системі, ми вважаємо призводить до явища венозного застою та венозного застою, що в свою чергу впливає на зменшення артеріального кровонаповнення та об'ємної швидкості кровотоку. Виявлені гемодинамічні особливості головного мозку дітей з порушеннями рухової активності центрального генезу можуть бути використані для визначення їх реабілітаційного потенціалу та прогнозування подальшого розвитку рухової функції, що сприятиме розробці нових і підвищенню ефективності існуючих медико-біологічних реабілітаційних і тривалих психолого-педагогічних заходів.

**І.В. Головченко, Н.І. Гайдай**

## **ЦЕРЕБРАЛЬНАЯ ГЕМОДИНАМИКА ДЕТЕЙ ОТ 8 ДО 12 ЛЕТ С НАРУШЕНИЕМ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЦЕНТРАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

У детей с нарушением двигательной активности наблюдается недостаточность кровоснабжения головного мозга, наиболее выраженная в системе позвоночных артерий правой гемисферы и низкая объемная скорость кровотока как в системе внутренних сонных артерий, так и в системе позвоночных артерий. Можно сделать вывод о нарушении венозного оттока из полости черепа у детей основной группы, что сопровождается нарушением венозной циркуляции в синусах мозга. Установлено, что в системе позвоночных артерий наблюдается межполушарная асимметрия роста в правой гемисфере, в отличие от левой, тонуса сосудов артериального и венозного типа мелкого калибра. Дети с нарушением двигательной активности имеют более высокие значения показателей венозного оттока, чем дети контрольной группы, и у них лучший венозный отток из каротидной системы и несколько хуже с вертебрально-базиллярной. Ключевые слова: церебральная гемодинамика, кровенаполнения артериального русла, нарушение двигательной активности.

**I.V. Golovchenko, N.I. Hayday**

## **CEREBRAL HEMODYNAMICS IN CHILDREN OF 8-12 YEARS OLD WITH ALTERATIONS OF THE MOTOR ACTIVITY OF CENTRAL ORIGIN**

In children with altered physical activity there is a lack of brain blood supply, which is the most pronounced in the system of the vertebral arteries right hemisphere, and a low volume speed of blood flow in the internal carotid artery and in the system of the vertebral arteries. Children of the main group have a decreased venous outflow from the cavity of the skull, which is accompanied by altered venous circulation in the sinuses of the brain. It is established that in the system of the vertebral arteries a hemispheric asymmetry of growth in the right hemisphere is observed, in contrast to the left hemisphere, indicators of vascular tone of arterial and venous type of small caliber. Children with altered physical activity have higher values of indicators of venous outflow, than the children of the control group, and they have better venous outflow from the system and a slightly worse with vertebro-basilar.

Key words: cerebral hemodynamics, blood arterial bed, the motion activity.

*Kherson Univeristy*

## **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Бронников В.А., Абрамова Н.А. Высшие психические функции у детей со спастическими формами цере-

- бральных параличей // Журн. неврологии и психиатрии. – 2004. – № 10. – С. 65–68.
2. Бурцев Е.М., Дьяконова Е.Н. Классификация и топическая диагностика нарушений мозгового кровообращения у новорожденных детей // Там же. – 1997. – **97**, № 8. – С. 4–7.
3. Витензон, А.С. Искусственная коррекция движений при патологической ходьбе. – М.: ООО Зеркало, 1999. – 503 с.
4. Дамулин И.В. Спастичность после инсульта // Рус. мед. журн. – 2005. – **13**, № 7. – С. 501–506.
5. Евтушенко С.К., Евтушенко О.С., Москаленко М.А., Сажнева И.А. Мозговой кровоток у больных с гемипаретической формой ДЦП // Проблемы УЗДГ в дослідженні венозної патології мозку та їх вирішення в неврології, психіатрії: матеріали Міжнар. наук.-практ. мед. конф. – К., 2000.
6. Живолупов С.А., Самарцев И.Н. Нейропластичность патофизиологические аспекты и возможности терапевтической модуляции // Журн. неврологии и психиатрии. – 2009. – **109**, вып. 4. – С. 78–85.
7. Козьявкин В.И. Система интенсивной нейрофизиологической реабилитации больных с поражением нервной системы. – Львов, Трускавец: МАЛТИ-М., 1999. – 48 с.
8. Колкер І.А. Нейропатологічні механізми зорових і слухових порушень у дітей зі спастичними формами дитячого церебрального паралічу: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Одеса, 2005. – 20 с.
9. Комшук Т. Електрична активність мозку при гіперкінезах // Наук. вісн. Волин. держ. ун-ту. Біол. науки. – 1999. – Вип. 4. – С. 55–58.
10. Одинак М.М., Михайленко А.А. Сосудистые заболевания головного мозга. – СПб.: Гиппократ. – 2003. – 158 с.
11. Осипова Е.В. Закономерности метаболических реакций у детей с различной функциональной активностью полушарий головного мозга при неврологических синдромах: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Иркутск, 2005. – 33 с.
12. Семенова К.А. Восстановительное лечение больных с резидуальной стадией детского церебрального паралича. – М.: Антидор, 1999. – 384 с.
13. Симоненко В.Б. Основы кардионеврологии. – М.: Медицина, 2001. – С. 238.
14. Станівчук О.О. Церебральні венозні дисциркуляції у хворих на затримку психомоторного розвитку // Проблеми УЗДГ в дослідженні венозної патології мозку та їх вирішення в неврології, психіатрії: матеріали Міжнар. наук.-практ. мед. конф. – К., 2000.
15. Физиология кровообращения. Регуляция кровообращения / Под. ред. П.Г. Костюка. – Л.: Наука, 1986. – 640 с.
16. Хуан Ц.Х. Психофизическая коррекция морфофункциональных нарушений при детском церебральном параличе в условиях реабилитационного (фитнес) центра: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2006. – 20 с.
17. Цибенко В.О. Фізіологія серцево-судинної системи. – К.: Фітосоціоцентр, 2002. – 248 с.
18. Шипицына Л.М., Мамайчук И.И. Психология детей с нарушениями функций опорно-двигательного аппарата. – М.: ВЛАДОС, 2004. – 368 с.
19. Яруллин Х.Х. Клиническая реоэнцефалография. – М.: Медицина, 1983. – 272 с.
20. Numata Y., Onuma A., Kobayashi Y. Brain magnetic resonance imaging and motor and intellectual functioning in 86 patients born at term with spastic diplegia // Dev. Med. Child. Neurol. – 2013. – 55 (2).

Херсон. ун-т  
E-mail: igorusha@amik.ru

Матеріал надійшов до  
редакції 22.11.2012

В.А. Головки, Е.А. Лебедева

## Участие чувствительного к лидокаину и тетродотоксину тока в генерировании фазы быстрой деполяризации потенциалов действия с низкой ее скоростью у клеток синоаурикулярного узла мыши

*Исследовали эффекты специфических блокаторов натриевых каналов – лидокаина и тетродотоксина (ТТХ) – на генерирование потенциалов действия (ПД) клеток, работающих в режимах истинного и скрытого водителей ритма, в синоаурикулярной (СА) области сердца мыши. Лидокаин (25 мкмоль/л) и ТТХ (25 мкмоль/л) снижали скорость фазы быстрой деполяризации ( $dV/dt_{\text{макс}}$ ) ПД в среднем на 40–50 % у клеток с  $dV/dt_{\text{макс}} \approx 3$  В/с. Продолжительность пика ПД возрастала на 30–35 % за счет увеличения его длительности на уровне 20 % реполяризации. Зависимость  $dV/dt_{\text{макс}}$  ПД клеток СА-узла от концентрации лидокаина (5–500 мкмоль/л) совпадала с кривой, заданной уравнением Хилла. Пороговая концентрация лидокаина составляла  $\approx 20$  мкмоль/л, эффективная (подавляющая  $dV/dt_{\text{макс}}$  на 50 %) –  $\approx 35$  мкмоль/л. Клетки, работающие в режиме скрытого водителя ритма, в области артерии СА-узла ( $15 \pm 4$  В/с) оказались более чувствительными к блокаторам натриевого тока. В целом полученные результаты свидетельствуют об участии входящего натриевого тока в генерировании фазы быстрой деполяризации ПД у самых «медленных» клеток СА-узла сердца мыши. Ключевые слова: синоаурикулярный узел, трансмембранные потенциалы действия, лидокаин, тетродотоксин, мышь.*

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что направленный внутрь потенциалзависимый натриевый ток участвует в формировании фазы быстрой деполяризации («upstroke»,  $dV/dt_{\text{макс}}$ ) потенциалов действия (ПД) и в проведении импульсов у возбудимых клеток. Тот факт, что у клеток синоаурикулярной (СА) области с  $dV/dt_{\text{макс}} > 20$  В/с в формирование фазы быстрой деполяризации ПД (фаза 0) существенный вклад вносит чувствительный к тетродотоксину (ТТХ) натриевый ток, не вызывает сомнений. Показано, что после добавления ТТХ (3–20 мкмоль/л) в солевой раствор у таких клеток  $dV/dt_{\text{макс}}$  ПД замедляется в 4–20 раз по сравнению с контролем. На основании экспериментов,

построены вольт-амперные характеристики для натриевого тока [3, 8, 16]

Вместе с тем вопрос о роли натриевого тока в генерировании фазы быстрой деполяризации ПД клеток центральной зоны СА-узла млекопитающих до сих пор остается предметом для дискуссий. Высказано мнение, что у клеток с самым медленным нарастанием ПД в фазу 0 натриевого тока инактивирован или слишком мал [9, 14]. Однако в литературе имеются сведения о возможном участии данного тока в формировании фазы быстрой деполяризации ПД клеток ( $dV/dt_{\text{макс}} \approx 4–5$  В/с) СА-узла сердца человека [20]. Порог для активации этого входящего тока находится на уровне около –60 мВ. В СА-узле сердца кролика, крысы и мыши обнаружена экспрессия

© В.А. Головки, Е.А. Лебедева

изоформ  $\text{Na}_v 1,1$  и  $\text{Na}_v 1,5$ , которые формируют поры потенциалзависимых натриевых каналов [13, 18].

Ранее было показано, что в СА-узле кролика у клеток типа истинного водителя ритма ( $dV/dt_{\text{макс}} \approx 3 \text{ В/с}$ ) замещение натрия на трис (2-амино-2-(гидроксиметил)-пропан-1,3-диол) в солевом растворе приводило к пропорциональному снижению скорости фазы быстрой деполяризации ПД [1]. Это может свидетельствовать о вкладе тока, переносимого с участием  $\text{Na}^+$ , в генерировании фазы быстрой деполяризации ПД клеток млекопитающих. Важно отметить, что фаза 0 потенциалов действия у данного типа клеток с  $dV/dt_{\text{макс}} \approx 3 \text{ В/с}$  не замедляется в присутствии тетродотоксина (3–30 мкмоль/л) [8] или снижается незначительно –  $\leq 15\%$  [3].

Изложенные данные дают основание предположить, что входящий с участием натриевого тока может вносить заметный вклад в формирование фазы быстрой деполяризации ПД у клеток СА-узла с самой медленной  $dV/dt_{\text{макс}}$ . Вероятно, участие, наряду с кальциевым током L-типа, натриевого тока повышает надежность генерирования ПД у клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма сердца млекопитающих. Для проверки этой гипотезы мы исследовали эффекты специфических блокаторов натриевых каналов (лидокаин, ТТХ) на величину  $dV/dt_{\text{макс}}$  – показателя суммарного входящего тока во время фазы быстрой деполяризации ПД. Одновременно анализировали влияние блокаторов на основные электрофизиологические параметры ПД клеток в области артерии СА-узла.

## МЕТОДИКА

**Животные.** Опыты проводили на самцах белых мышей ( $n=26$ ) в возрасте 8–16 нед массой  $30 \pm 5 \text{ г}$  из питомника животных Института биологии Коми НЦ УрО РАН. Протокол экспериментов был одобрен независимой комиссией по этике Института физиологии Коми

НЦ УрО РАН (прот. №14 от 24 декабря 2009 года). Исследования выполнены с соблюдением международных правил (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th Edition опубликованной the National Academies Press (US) 2011). Животных обездвигивали путем мгновенного смещения шейных позвонков, вскрывали грудную клетку и быстро извлекали сердце.

**Регистрация ПД.** Препарат имел размер  $3 \times 2 \text{ мм}$  и включал область СА-узла, фрагмент ушка правого предсердия с поперечным гребешком (*crista terminalis*) и сегменты верхней и нижней полых вен (*superior u inferior vena cava*) [2, 21]. Затем препарат помещали в проточную термостатируемую камеру, заполненную раствором Тироде следующего состава (ммоль/л):  $\text{NaCl}$  – 140;  $\text{NaHCO}_3$  – 10;  $\text{KCl}$  – 5,4;  $\text{CaCl}_2$  – 1,8;  $\text{MgSO}_4$  – 1; глюкоза – 10;  $\text{HEPES}$  – 5;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 0,33; pH 7,4. Раствор при поступлении в камеру аэрировали смесью воздуха и  $\text{O}_2$  при  $31 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ . ТТХ и лидокаин («Sigma-Aldrich», Германия) растворяли в деионизированной воде. Стоковые растворы хранились в холодильнике при  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

ПД регистрировали с помощью стеклянных микроэлектродов, заполненных 2,5 моль/л  $\text{KCl}$  с начальным сопротивлением 20–30 МΩ. Диаметр кончика контролировали под микроскопом («Tesla», Чехия) так, чтобы наружный диаметр кончика микропипеток не превышал 0,2 мкм. Рабочий диапазон усилителя «Electro 705» («World Precision Instruments», США) составлял от 0 до 5 кГц. ПД записывали через аналого-цифровой преобразователь тип E14-140 (L-CARD, Россия) на жесткий диск компьютера. Анализировали следующие показатели ПД: амплитуду (АПД), максимальный диастолический потенциал ( $E_{\text{макс}}$ , милливольты), длительность пика на уровне 20 % (ДПД<sub>20</sub>), 50 % (ДПД<sub>50</sub>), 90 % (ДПД<sub>90</sub>) и 100 % (ДПД<sub>100</sub>) реполяризации, миллисекунды, длительность диастолической деполяризации (ДД, миллисекунды), частоту генерации ПД (ЧСС, импульсы в минуту), максимальную скорость нарастания

ПД в фазу 0 ( $dV/dt_{\text{макс}}$ , Вольты на секунду) и скорость фазы медленной диастолической деполяризации ( $V_4$ , милливольты на секунду).

**Статистика.** Средние значения и среднее квадратичное отклонение ( $M \pm \sigma$ ) для каждой серии рассчитывали по результатам 3–12 экспериментов. Для сравнения групп по средним значениям показателей ПД применяли парный и непарный методы. Данные приведены как среднее арифметическое  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm \sigma$ ). Значимость различий определяли по критерию U Манна–Уитни. Различия считали значимыми при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Общая характеристика пейсмекерных ПД.** В сино-аурикулярной области вдоль артерии СА узла со стороны субэндокарда регистрировали ПД с медленной диастолической

деполяризацией и скоростью нарастания переднего фронта ПД  $dV/dt_{\text{макс}}$  от 2 до 32 В/с. Зарегистрированные ПД были условно разделены на два типа: истинного и скрытого водителей ритма. К истинным относили ПД с  $dV/dt_{\text{макс}} < 7$  В/с, наиболее длительным пиком ПД на уровне 50 и 90 % реполяризации и плавным переходом от фазы медленной диастолической деполяризации (фаза 4) к фазе быстрой деполяризации (фаза 0) (рис. 1, а). ПД с медленной ДД, но более высоким значением  $dV/dt_{\text{макс}}$  ( $> 9$  В/с) рассматривали как ПД клеток скрытого водителя ритма (см. рис. 1, б). Таким образом, впервые получены результаты, свидетельствующие о том, что в области артерии СА-узла мыши существуют клетки водителя ритма с медленной  $dV/dt_{\text{макс}} = 2,9 \pm 1,6$  В/с ( $n_{\text{препаратов}} = 25$ ).

**Эффекты лидокаина.** Лидокаин является одним из наиболее доступных специфиче-

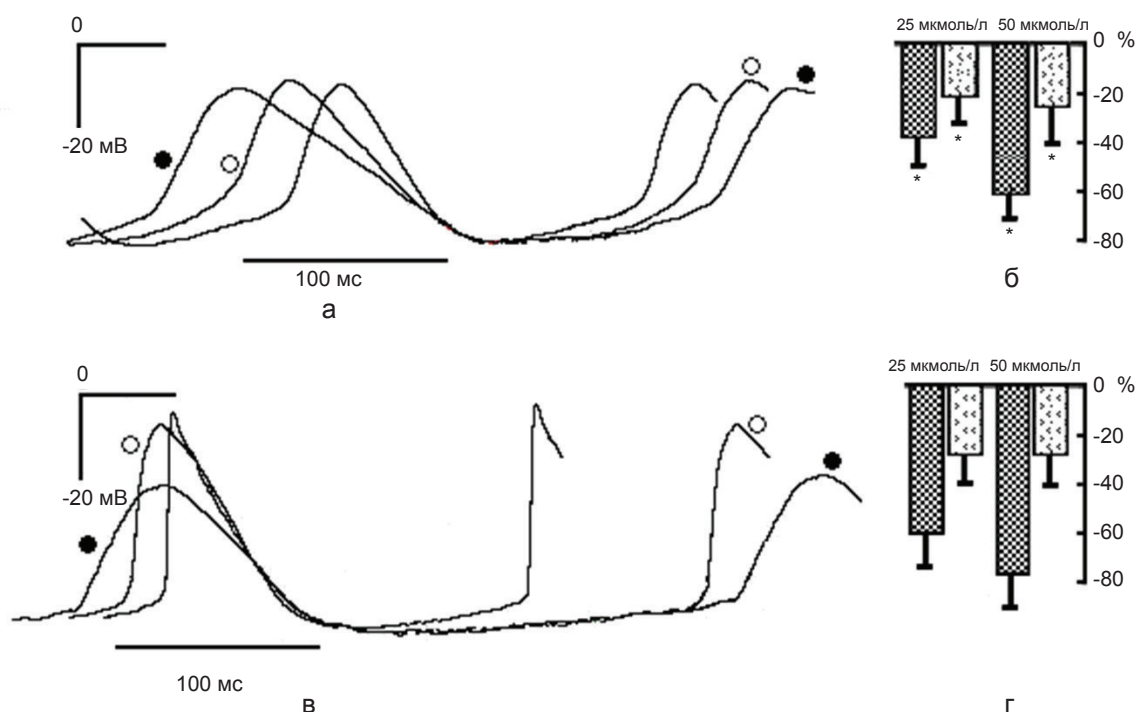


Рис. 1. Изменение конфигурации потенциала действия (ПД) спонтанно сокращающихся полосок синоаурикулярного узла мыши при экспозиции лидокаина (○ – 25; ● – 50 мкмоль/л): а – ПД клетки типа истинного водителя ритма в нормальном растворе ( $dV/dt_{\text{макс}} \sim 3$  В/с) и после добавления лидокаина (1,8 и 1,2 В/с соответственно); в – ПД клетки типа скрытого водителя ритма в нормальном растворе ( $dV/dt_{\text{макс}} \sim 19$  В/с) и при воздействии блокатора (9 и 2 В/с соответственно); б и г – изменение  $dV/dt_{\text{макс}}$  (заштрихованные столбики) и  $V_4$  (светлые столбики) у клеток типа истинного (б) и скрытого (г) водителей ритма. Уровень 0 % соответствует контролю



ских блокаторов потенциалуправляемых натриевых каналов и широко используется в практической медицине как локальный анестетик. Мы не нашли данных о блокировании лидокаином кальциевого тока L-типа. Мы исследовали влияние блокатора в диапазоне концентрации от 5 до 500 мкмоль/л на основные электрофизиологические характеристики ПД. Установлено, что у полосок, сокращающихся спонтанно с частотой  $315 \pm 36$  имп/мин ( $n = 25$ ), лидокаин существенно влиял на длительность ПД на уровне 20 % реполяризации, замедлял скорость нарастания ПД в фазу 0 и скорость фазы ДД,  $V_4$  (см. рис. 1).

*Эффекты лидокаина на клетки типа истинного водителя ритма.* Лидокаин в концентрации 5–12 мкмоль/л не оказывал влияния на показатели ПД клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма. Повышение концентрации лидокаина от 12 до 25 мкмоль/л приводило к снижению  $dV/dt_{\text{макс}}$  ПД от  $2,6 \pm 0,8$  В/с до  $1,4 \pm 0,3$  В/с ( $n_{\text{полосок}} = 5$ ;  $P < 0,05$ ). Зарегистрировано увеличение длительности ДПД<sub>20</sub> на 50 % и медленной ДД на 23 %, а также замедление скорости ее фазы на 15–30 %. В результате частота генерации ПД у клеток истинного водителя ритма за-

медлялась в среднем на 16 % по сравнению с контролем (см. рис. 1,а).

Увеличение концентрации лидокаина в два раза (50 мкмоль/л) приводило к дальнейшему снижению  $dV/dt_{\text{макс}}$  ( $1 \pm 0,2$  В/с). Эффекты блокатора на остальные анализируемые показатели ПД (ДПД<sub>20</sub>, длительность и скорость ДД, ЧСС) аналогичны полученным при концентрации лидокаина 25 мкмоль/л. При его концентрации 500 мкмоль/л значение  $dV/dt_{\text{макс}}$  было в среднем на 60 % ниже, чем в нормальном растворе Тироде. Длительность ДД возрастала в два раза, а скорость – снижалась вдвое по сравнению с контролем и на 30–35 % по сравнению с концентрацией лидокаина 50 мкмоль/л (см. рис. 1,а,б).

Анализ зависимости скорости фазы 0,  $dV/dt_{\text{макс}}$  ПД от концентрации лидокаина в перфузионном растворе выявил, что полученные результаты соответствуют кривой, заданной уравнением Хилла (рис. 2). Пороговая концентрация лидокаина составила  $\approx 20$  мкмоль/л, а эффективная, подавляющая  $dV/dt_{\text{макс}}$  на 50 % ( $EC_{50}$ )  $\approx 35$  мкмоль/л.

Полученные данные свидетельствуют о наличии в клетках истинного водителя ритма СА-узла мыши натриевых каналов, чувстви-

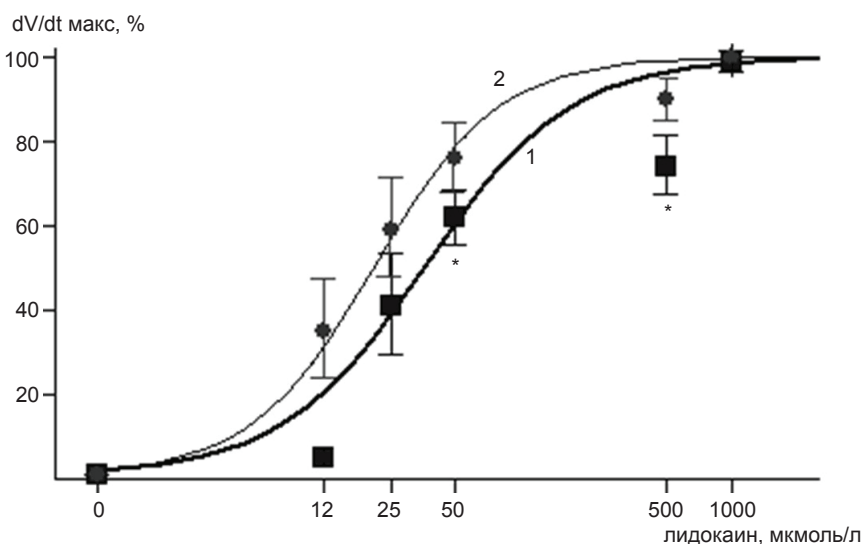


Рис. 2. Блокирование скорости фазы быстрой деполяризации ( $dV/dt_{\text{макс}}$ ) потенциала действия клеток, работающих в режиме истинного (1) и скрытого (2) водителей ритма в зависимости от концентрации лидокаина. Сплошные линии соответствуют значениям, вычисленным по уравнению Хилла. Значения приведены как  $M \pm \sigma$ . \*  $P < 0,05$  по сравнению с клетками типа скрытого водителя ритма

тельных к лидокаину. Эти клетки генерировали ПД с самой низкой  $dV/dt_{\text{макс}}$  в фазу 0.

**Эффекты лидокаина на клетки скрытого водителя ритма.** У полосок СА-области клетки скрытого водителя ритма генерировали ПД с частотой  $316 \pm 39$  имп/мин и значением  $dV/dt_{\text{макс}}$ , равным  $15,5 \pm 4,0$  В/с ( $n=22$ ). Экспозиция препарата в растворе с лидокаином ( $12$  мкмоль/л) вызывала снижение  $dV/dt_{\text{макс}}$  ПД до  $10 \pm 3$  В/с (на  $33\%$ ) по сравнению с контролем ( $n_{\text{препаратов}}=4$ ;  $n_{\text{клеток}}=15$ ;  $P<0,01$ ). Остальные характеристики ПД при этом не изменялись. Повышение концентрации лидокаина ( $25$  мкмоль/л) приводило к замедлению  $dV/dt_{\text{макс}}$  на  $25\%$  по сравнению с  $12$  мкмоль/л и на  $58\%$  относительно контроля. Продолжительность фазы 4 увеличивалась на  $45\%$ , а ее скорость снижалась на  $28\%$ . В результате частота генерации ПД замедлялась в среднем на  $20\%$  по сравнению с контролем. Лидокаин в концентрации  $50$  мкмоль/л вызывал дальнейшее снижение  $dV/dt_{\text{макс}}$  на  $20\%$ , но не значительно изменял остальные электрофизиологические показатели ПД по сравнению с  $25$  мкмоль/л (см. рис. 1, в, г). Повышение концентрации блокатора ( $500$  мкмоль/л) вызывало замедление  $dV/dt_{\text{макс}}$  на  $30\%$  по сравнению с  $50$  мкмоль/л и на  $78\%$  по сравнению с контролем. На 5-й минуте экспозиции было отмечено замедление частоты генерирования ПД (рис. 3), но остановки спонтанной актив-

ности при этом не наблюдали.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что клетки скрытого водителя ритма СА-узла мыши более чувствительны к лидокаину, чем клетки истинного водителя ритма.

**Эффекты ТТХ на ПД клеток типа истинного водителя ритма.** ТТХ остается наиболее распространенным блокатором при анализе электрической активности потенциалуправляемых натриевых каналов у кардиомиоцитов. Нами исследовано влияние ТТХ на конфигурацию ПД у самых медленных клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма в СА-узле мыши.

После добавления в солевой раствор ТТХ ( $25$  мкмоль/л) регистрировали снижение  $dV/dt_{\text{макс}}$  от  $1,8$  до  $1$  В/с ( $n=3$ ;  $P \leq 0,05$ ). Скорость фазы ДД замедлялась на  $50\%$ . В результате частота генерирования ПД снижалась на  $25\text{--}30\%$  по сравнению с контролем (рис. 4, а). Следует отметить, что после экспозиции ТТХ возрастала длительность ПД на уровне  $20\%$  реполяризации, от  $51 \pm 2$  до  $65 \pm 8$  мс ( $n_{\text{препаратов}}=3$ ;  $P < 0,05$ ). Как следствие увеличивалась длительность ПД на уровне  $90\%$  реполяризации. Полученные результаты свидетельствуют о подавлении ТТХ  $dV/dt_{\text{макс}}$ , увеличении длительности ПД на уровне  $20\%$  реполяризации и снижении скорости ДД почти в два раза по сравнению с контролем (см. рис. 4, а).

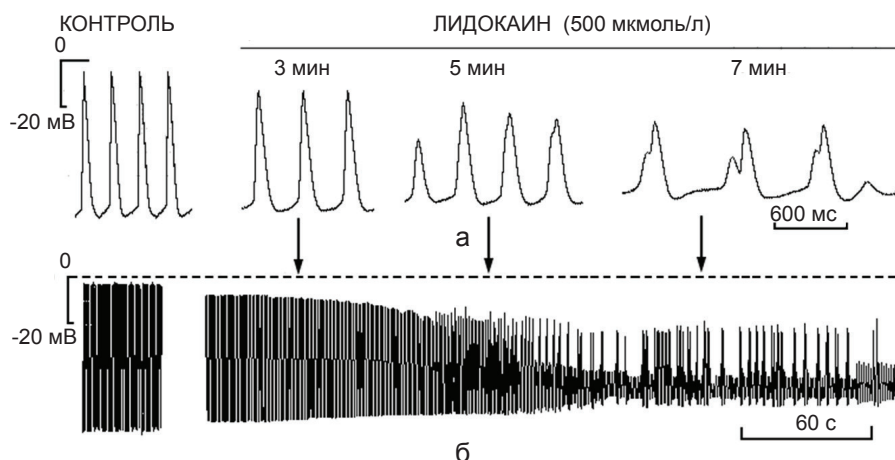


Рис. 3. Развитие эффектов лидокаина на потенциал действия (ПД) клеток, работающих в режиме скрытого водителя ритма синоаурикулярного узла мыши: а – изменение конфигурации ПД; б – запись ПД при сжатой временной шкале

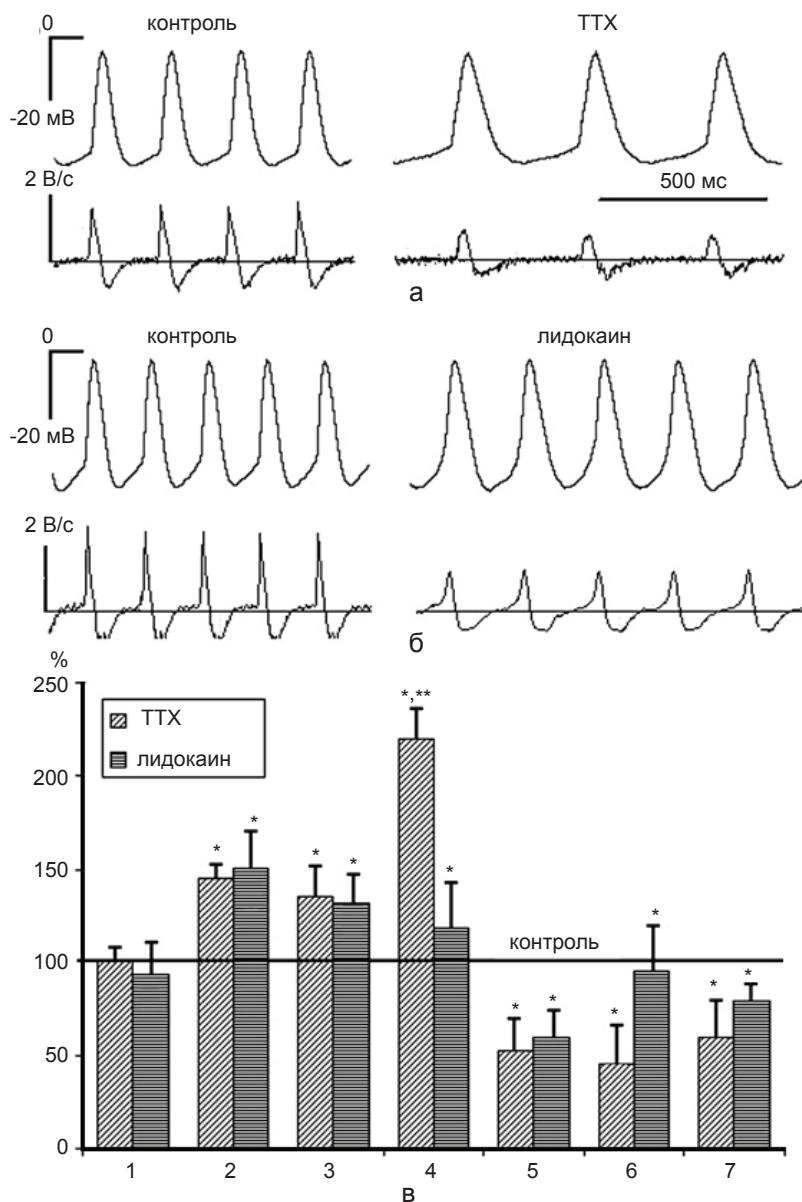


Рис. 4. Эффекты блокаторов натриевых каналов на генерирование потенциалов действия (ПД) клеток типа истинного водителя ритма синоаурикулярного узла мыши: а и б – эффекты тетродотоксина (ТТХ) и лидокаина по 25 мкмоль/л на конфигурацию ПД и скорость фазы быстрой деполяризации ( $dV/dt_{\text{макс}}$ ); в – изменения электрофизиологических показателей ПД клеток в растворе с ТТХ и лидокаином. Уровень 100 % соответствует контролю. \* $P < 0,05$  значимость по сравнению с контролем; \*\* $P < 0,05$  – по сравнению с лидокаином: 1 – амплитуда ПД; 2 и 3 – длительность ПД на уровне 20 и 90 % реполяризации; 4 – диастолическая деполяризация; 5 – максимальная скорость фазы быстрой деполяризации ПД; 6 – скорость фазы ДД; 7 – частота спонтанных сокращений

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами получены данные, свидетельствующие о том, что в правом ушке в области артерии СА-узла мыши существуют клетки водителя

ритма, характеризующиеся низкими величинами первой производной нарастания ПД в фазу 0 ( $dV/dt_{\text{макс}}$  равна в среднем 3 В/с). Эти результаты дополняют имеющиеся в литературе [5, 12, 19] сведения об основных

электрофизиологических показателях ПД клеток синусно-предсердной области мыши.

До настоящего времени не ясно, какое влияние оказывает лидокаин – препарат, широко применяемый в клинике для местной анестезии, – на генерацию ПД клетками водителя ритма в СА-области сердца млекопитающих. Хорошо изучено его ингибирующее действие на натриевые каналы нервных волокон [15]. Имеются сведения об ингибирующем влиянии лидокаина на частоту сокращений у перфузируемых по Лангендорфу изолированных предсердий крысы [11] и морской свинки [4]. Мы исследовали влияние лидокаина на внутриклеточные ПД клеток СА-узла мыши с самой медленной скоростью нарастания фазы быстрой деполяризации ПД. Полученные данные свидетельствуют об участии чувствительного к лидокаину и ТТХ входящего натриевого тока в формировании  $dV/dt_{\text{макс}}$  ПД клеток водителя ритма.

Впервые получена кривая дозозависимого эффекта лидокаина на  $dV/dt_{\text{макс}}$  в диапазоне 5–500 мкмоль/л, установлены пороговая и эффективная концентрации лидокаина (см. рис. 2). Показано, что экспозиция лидокаина замедляла длительность пика ПД на уровне 20 % реполяризации (см. рис. 4,в). Следовательно, можно полагать, что увеличение продолжительности пика ПД обусловлено ингибированием анестетиком проводимости натриевых каналов.

Лидокаин замедлял скорость фазы ДД ПД, генерируемых клетками, работающими в режиме истинного и скрытого водителя ритма, в среднем на 25 %. По-видимому, лидокаин блокирует ток, активируемый гиперполяризацией [17], и/или опосредованно замедляет ток  $\text{Na}-\text{Ca}$ -обменного механизма [1].

Выявлены различия в чувствительности к лидокаину клеток, работающих в режиме истинного и скрытого водителя ритма (см. рис. 2). Эффективная концентрация лидокаина для клеток истинного водителя ритма была в 1,8 раза больше, чем для клеток скрытого водителя ритма. Для сравнения, у

новорожденных с наследственной мутацией гена *SCN5A* [6] величина  $\text{EC}_{50}$  для клеток водителя ритма со скоростью фазы быстрой деполяризации  $\approx 16$  В/с была почти в четыре раза выше, чем у клеток скрытого водителя ритма СА-узла мыши ( $\approx 15$  В/с).

Наши результаты свидетельствуют о том, что вклад потенциалуправляемых чувствительных к лидокаину и ТТХ натриевых каналов в формирование ПД клеток, работающих в режиме скрытого водителя ритма, больше по сравнению с клетками истинного водителя ритма. Это согласуется с теоретическими моделями клеток водителя ритма СА-узла кролика [22]. В модели СА-узла мыши [7] скорость фазы быстрой деполяризации потенциалов действия, генерируемых клетками, была постоянной, тогда как в наших опытах значение этого показателя снижалось на 40–50 % под влиянием блокаторов натриевых каналов. Мы полагаем, что при моделировании электрической активности клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма СА-узла мыши, следует также учитывать вклад входящего натриевого тока.

В последние годы значительно расширены представления о строении потенциалуправляемых натриевых каналов на молекулярном уровне и взаимодействии их с лидокаином и его производными. Натриевый канал представляет собой пору, образованную  $\alpha$ -субъединицей ( $\text{Na}_v$ ) и дополнительной  $\beta$ -субъединицей. Идентифицировано около десяти  $\alpha$ -субъединиц и четыре  $\beta$ -субъединицы. Изоформы  $\alpha$ -субъединиц по-разному экспрессированы в различных тканях и отличаются по своим фармакологическим свойствам. Например, изоформы  $\text{Na}_v1,1-1,3$  и  $\text{Na}_v1,6$  главным образом экспрессированы в нейронах центральной нервной системы и подавляются наномолярными концентрациями ТТХ. Изоформы  $\text{Na}_v1,5$  в основном экспрессированы в клетках рабочего миокарда предсердий и желудочков млекопитающих и подавляются микромолярными концентрациями ТТХ. Согласно наиболее распростра-

ненной гипотезе, лидокаин проникает внутрь поры натриевых каналов и связывается с фенилаланином (Phe-1579) и тирозином. При этом проводимость одиночного натриевого канала снижается на  $\approx 38\%$  [15].

В целом лидокаин и ТТХ вызывали сходные эффекты на клетки истинного водителя ритма СА-узла мыши (см. рис. 4,в). Однако ТТХ сильнее, чем лидокаин, замедлял фазу ДД. Скорее всего, это обусловлено химическим строением молекул ингибиторов и степенью специфичности действия на натриевые каналы. Судя по полученным результатам, можно полагать, что специфичность действия лидокаина на потенциалуправляемые натриевые каналы выше по сравнению с ТТХ. С помощью иммуноблоттинга матричной РНК показано, что изоформы  $Na_v1,1$  экспрессированы в центральной части, а  $Na_v1,5$  – на периферии СА-узла кролика [18] и мыши [13].

Итак, нами установлено, что у клеток синоу-предсердной области мыши лидокаин и ТТХ ингибировали скорость фазы быстрой деполяризации ПД. Ее снижение в среднем на 40–50 % наблюдали у «медленных» клеток с  $dV/dt_{\text{макс}}$  около 3 В/с. Продолжительность пика ПД возрастала на 30–35 % за счет увеличения длительности ПД на уровне 20 % реполяризации в два раза. Зависимость  $dV/dt_{\text{макс}}$  ПД клеток, работающих в режиме истинного или скрытого водителя ритма, от концентрации лидокаина подчиняется уравнению Хилла. В совокупности полученные результаты свидетельствуют об участии входящего натриевого тока в генерировании восходящей фазы ПД у самых «медленных» клеток СА-узла сердца мыши.

Активность натриевых каналов регулируется двумя фундаментальными механизмами: временем открывания одиночных каналов и изменением плотности количества каналов в плазматической мембране. Ключом к пониманию физиологической роли натриевого тока в формировании фазы быстрой деполяризации ПД у клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма, может

явиться расшифровка процессов быстрой и медленной инактивации натриевых каналов, сформированных с участием субъединиц каналов  $Na_v1,1$  и  $Na_v1,5$ .

*Работа выполнена при поддержке Уральского отделения Российской академии наук (проекты 12-П-4-1054 и 12-У-4-1022) и РФФИ (проект 12-04-32288 мол\_а, Л.Е.А.).*

**В.А. Головкин, Е.А. Лебедева**

#### **УЧАСТИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО К ЛИДОКАИНУ И ТЕТРОДОТОКСИНУ ТОКА В ГЕНЕРИРОВАНИИ ФАЗЫ БЫСТРОЙ ДЕПОЛЯРИЗАЦИИ ПОТЕНЦИАЛОВ ДЕЙСТВИЯ С НИЗКОЙ СКОРОСТЬЮ ФАЗЫ БЫСТРОЙ ДЕПОЛЯРИЗАЦИИ У КЛЕТОК СИНОАУРИКУЛЯРНОГО УЗЛА МЫШИ**

Проанализированы эффекты лидокаина и тетродотоксина, блокаторов натриевых каналов на трансмембранные потенциалы действия полосок синоаурикулярной (СА) области мыши. Эксперименты проводили с использованием микроэлектродной техники в растворе Тироде (31 °C). Установлено, что скорость фазы быстрой деполяризации ( $dV/dt_{\text{макс}}$ ) потенциалов действия (ПД) самых «медленных» клеток СА-узла замедлялась при действии лидокаина (25 мкмоль/л) и тетродотоксина (25 мкмоль/л) по сравнению с контролем от  $3,0 \pm 1,6$  до  $1,2 \pm 0,4$  В/с ( $n=5$ ,  $P<0,01$ ) и от  $1,6 \pm 0,1$  до  $0,8 \pm 0,1$  В/с ( $n=3$ ,  $P<0,01$ ) соответственно. Анализ дозозависимой кривой, построенной с помощью уравнения Хилла, показал, что снижение максимальной скорости деполяризации в фазу 0 на 50 % ( $EC_{50}$ ) происходило при экспозиции лидокаина  $\approx 35$  мкмоль/л, а пороговая концентрация составила  $\approx 20$  мкмоль/л. Следует отметить, что лидокаин и тетродотоксин замедляли длительность пика ПД за счет удлинения на уровне 20 %. Существенное замедление  $dV/dt_{\text{макс}}$  при действии блокаторов у клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма, свидетельствует об участии натриевого тока в формировании фазы быстрой деполяризации. Ключом к пониманию физиологической роли натриевого тока в формировании «upstroke» ПД у клеток, работающих в режиме истинного водителя ритма, может явиться расшифровка процессов быстрой и медленной инактивации натриевых каналов, сформированных с участием субъединиц каналов  $Na_v1,1$  и  $Na_v1,5$ .

*Ключевые слова:* синоаурикулярный узел, трансмембранные потенциалы действия, лидокаин, тетродотоксин, мышь.



V.V.A. Golovko, E.A. Lebedeva

# THE CONTRIBUTION OF LIDOCAINE- AND TTX- SENSITIVE CURRENT IN GENERATING OF UPSTROKE ACTION POTENTIAL IN THE CELLS OF SINUAURICULAR REGION OF MICE

Using microelectrode technique we examined the effects of the specific blockers of the inward  $\text{Na}^+$ -current, lidocaine and tetrodotoxin, on spontaneously beating strips of the sinoatrial region of the mouse. Exposure to lidocaine (25  $\mu\text{M}$ ) in true pacemaker increased the duration of the peak of the AP by extending the plateau phase (phase 2,  $\text{APD}_{20}$ ), slowing the  $dV/dt_{\text{max}}$  from  $2.6 \pm 0.8$  V/s ( $n=25$ ) to  $1.4 \pm 0.3$  V/s ( $n=5$ ,  $p \leq 0.05$ ) and reducing the velocity of DD by 20% in comparison with control. Analysis of dose-dependency revealed that the decrease the value of  $dV/dt_{\text{max}}$  depends on the concentration of lidocaine. The threshold concentration of lidocaine is 20  $\mu\text{M}$  and the  $\text{RC}_{50}$  of  $dV/dt_{\text{max}}$  is 35  $\mu\text{M}$ . TTX (25  $\mu\text{M}$ ) decreased the  $dV/dt_{\text{max}}$  from 1.6 to 0.8 V/s, DD velocity slowed by 49%. It should be noted that TTX and lidocaine caused the increase in the duration  $\text{APD}_{20}$ . The data indicate that the  $dV/dt_{\text{max}}$  AP of these cells was reduced by 35–45% after addition of the specific inward  $\text{Na}^+$ -current blockers: lidocaine and TTX. This fact confirms the involvement  $\text{Na}^+$ -current in generation of AP of the true pacemaker cells. A key to understanding the physiological role of  $\text{Na}^+$ -current in generating of upstroke AP in true pacemaker cells may be a description of the processes of fast and slow inactivation of  $\text{Na}^+$ -channels formed with subunits channels  $\text{Na}_v 1.1$  and  $\text{Na}_v 1.5$ .

Key words: transmembrane action potential, true pacemaker, sinoauricular node, lidocaine, tetrodotoxin, mouse.

*The Laboratory of Heart Physiology, Institute of Physiology, Komi Science Center, the Urals Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Головки В.А. Вклад медленного натриевого тока в механизм деполяризации сарколеммы клеток истинного водителя ритма сердца кролика // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2009. – **95**, №4. – С. 387–397.
2. Гонотков, М.А., Головки В.А. Отрицательный хронотропный эффект ионов цезия на генерацию трансмембранных потенциалов клеток синусно-предсердного узла у мыши // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2011. – **152**, № 8. – С. 128–131.
3. Baruscotti M., DiFrancesco D., Robinson R.B. A TTX-sensitive inward sodium current contributes to spontaneous activity in newborn rabbit sino-atrial node cells // J. Physiol. – 1996. – **492**. – P. 21–30.
4. Bosnjak Z.J., Stowe D.F., Kampine J.P. Comparison of lidocaine and bupivacaine depression of sinoatrial nodal activity during hypoxia and acidosis in adult and neonatal guinea pigs // Anesth Analg. – 1986. – **65**. – P. 911–917.

5. Cho H.S., Takano M., Noma A. The electrophysiological properties of spontaneously beating pacemaker cells isolated from mouse sinoatrial node // J. Physiol. – 2003. – **550**. – P. 169–180.
6. Derangeon M., Montnach J., Baró I., Charpentier F. Mouse models of SCN5A-related cardiac arrhythmias // Front Physiol. – 2012. – **3**. – P. 1–4.
7. Kharche S., Yu J., Lei M., Zhang H. A mathematical model of action potentials of mouse sinoatrial node cells with molecular bases // Amer. J. Physiol. Heart Circulat. Physiol. – 2011. – **301**. – P. 945–963.
8. Kodama I., Nikmaram M.R., Boyett M.R., Suzuki R., Honjo H., Owen J.M. Regional differences in the role of the  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  currents in pacemaker activity in the sinoatrial node // Amer. J. Physiol. – 1997. – **272**. – P. 2793–2806.
9. Kurata Y., Matsuda H., Hisatome I., Shibamoto T. Regional difference in dynamical property of sinoatrial node pacemaking: role of  $\text{Na}^+$  channel current // Biophys J. – 2008. – **95**. – P. 951–977.
10. Lei M., Jones S.A., Liu J., Lancaster M. K., Fung S.S., Dobrzynski H., Camelliti P., Maier S.K., Noble D., Boyett M.R. Requirement of neuronal- and cardiac-type sodium channels for murine sinoatrial node pacemaking // J. Physiol. – 2004. – **559**. – P. 835–848.
11. Létienne R., Vié B., Le Grand B. Pharmacological characterisation of sodium channels in sinoatrial node pacemaking in the rat heart // Eur. J. Pharmacol. – 2006. – **530**. – P. 243–249.
12. Liu J., Dobrzynski H., Yanni J., Boyett M.R., Lei M. Organisation of the mouse sinoatrial node: structure and expression of HCN channels // Cardiovascular. Res. – 2007. – **73**. – P. 729–738.
13. Maier S.K., Westenbroek R.E., Yamanushi T.T., Dobrzynski H., Boyett M.R., Catterall W.A., Scheuer T. An unexpected requirement for brain-type sodium channels for control of heart rate in the mouse sinoatrial node // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – **100**. – P. 3507–3512.
14. Maltsev V.A., Lakatta E.G. Dynamic interactions of an intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  clock and membrane ion channel clock underlie robust initiation and regulation of cardiac pacemaker function // Cardiovascular. Res. – 2008. – **77**, №2. – P. 274–284.
15. McNulty M.M., Edgerton G.B., Shah R.D., Hanck D.A., Fozzard H.A., Lipkind G.M. Charge at the lidocaine binding site residue Phe-1759 affects permeation in human cardiac voltage-gated sodium channels // J. Physiol. – 2007. – **581**(Pt 2) – P. 741–755.
16. Protas L., Oren R. V., Clancy C. E., Robinson R. B. Age-dependent changes in Na current magnitude and TTX-sensitivity in the canine sinoatrial node // J. Mol Cell Cardiol. – 2010. – **48**. – P. 172–180.
17. Rocchetti M., Armato A., Cavalieri B., Micheletti M., Zaza A. Lidocaine inhibition of the hyperpolarization-activated current (I<sub>f</sub>) in sinoatrial myocytes // J. Cardiovascular. Pharmacol. – 1999. – **34**. – P. 434–439.
18. Tellez J. O., Dobrzynski H., Greener, I. D., Graham G. M.,

- Laing E., Honjo H., Hubbard S. J., Boyett M. R., Billeter R. Differential Expression of Ion Channel Transcripts in Atrial Muscle and Sinoatrial Node in Rabbit // *Circulat. Res.* – 2006. – **99**. – P. 1384–1393.
19. Temple J., Frias P., Rottman J., Yang T., Wu Y., Verheijck E.E., Zhang W., Siprachanh C., Kanki H., Atkinson J.B., King P., Anderson M.E., Kupersmidt S., Roden D.M. Atrial fibrillation in KCNE1-null mice // *Ibid.* – 2005. – **97**, №1. – P. 62–69.
20. Verkerk A.O., Wilders R., van Borren M.M., Peters R.J.G., Broekhuis E., Lam K., Coronel R., de Bakker J.M., Tan H.L. Pacemaker current ( $I_p$ ) in the human sinoatrial node // *Eur. Heart. J.* – 2007. – **28**. – P. 2472–2478.
21. Viswanathan S., Burch J.B., Fishman G.I., Moskowitz I.P., Benson D.W.. Characterization of sinoatrial node in four conduction system marker mice// *J. Mol Cell Cardiol.* – 2007. – **42**, № 5. – P. 946–953.
22. Zhang H., Holden A.V., Kodama I., Honjo H., Lei M., Varghese T., Boyett M.R. Mathematical models of action potentials in the periphery and center of the rabbit sinoatrial node // *Amer. J. Physiol Heart. Circ ulat. Physiol.* – 2000. – **279**. – P. 397–421.

*Ин-т физиологии Коми науч. центра Уральского отделения  
Российской академии наук, г. Сыктывкар  
E-mail: golovko@physiol.komisc.ru*

*Материал поступил в  
редакцию 16.04.2013*

А.Г. Моренко, О.С. Павлович, І.Я. Коцан

## Кірккові активаційні процеси у чоловіків із високою та низькою вихідною індивідуальною частотою $\alpha$ -ритму під час сенсомоторної діяльності різної складності

*У дослідженні взяли участь 104 здорових і праворуких чоловіків у віці від 19 до 21 року, які за значенням медіани розподілу усередненої у всіх частках кори індивідуальної частоти  $\alpha$ -активності (IAF) були розділені на дві групи – з високим ( $n = 53$ ,  $IAF \geq 10,04$  Гц) і низьким ( $n = 51$ ,  $IAF \leq 10,03$  Гц) рівнями IAF. У чоловіків із високим рівнем IAF спостерігаються більш економічні та локальні активаційні процеси в корі і низхідні впливи фронтальної зони, що, ймовірно, є механізмом полегшення взаємодії часток кори. Чоловіки з низьким рівнем IAF відрізняються більш високою інтенсивністю застосування неспецифічних активаційних стратегій. Це свідчить про більшу суб'єктивну складність для них поставлених завдань та залучення додаткових механізмів для обробки інформації. Ключові слова: індивідуальна частота  $\alpha$ -ритму, сенсомоторна діяльність, потужність коливань електроенцефалограми.*

### ВСТУП

Серед фізіологічних методик, які дають змогу прямо оцінити індивідуальні особливості діяльності головного мозку будь-якої людини, є реєстрація електроенцефалограми (ЕЕГ). При цьому цінність виявляють дані так званої фоновій електричній активності головного мозку або фоновій ЕЕГ, оскільки вважається, що саме характер спонтанної електричної активності кори тієї або іншої людини визначається генетично зумовленими особливостями структурно-функціональної організації її мозку [9, 15, 17]. Зрозумілим є і те, що саме останні лежать в основі індивідуально-типологічних відмінностей [1, 6, 10, 12, 18, 19]. З'ясувалося, що серед різних ритмів фоновій ЕЕГ найбільшу інформативність для визначення стану основних психофізіологічних функцій тієї або іншої людини має індивідуальна варіативність амплітудно-частотних характеристик  $\alpha$ -ритму ЕЕГ, зокрема частота максимального його піку [1, 6]. Вважається,

© А.Г. Моренко, О.С. Павлович, І.Я. Коцан

що переважання в фоновій ЕЕГ низько- або високочастотного діапазону  $\alpha$ -ритму, може розглядатися як надійний прогностичний критерій результативності різних видів професійної діяльності та інтелектуальних здібностей [1, 9, 11, 16]. Таке твердження ґрунтується на тому, що домінантна частота ЕЕГ генетично зумовлена, а різні частотні діапазони  $\alpha$ -активності мають відмінні мозкові генератори та є відображенням різних функцій [1, 2, 10, 16]. Десинхронізація (блокування)  $\alpha$ -ритму в нижньому і середньому  $\alpha$ -діапазонах асоціюється з такими процесами уваги, як пильність і очікування, а у верхньому  $\alpha$ -діапазоні – відображає посилення розумової активності [14, 16]. Важливим є і той факт, що при паралельній реєстрації ЕЕГ та функціональної магнітно-резонансної томографії було чітко доведено, що блокування  $\alpha$ -ритму в певній ділянці кори чітко корелює зі зростанням її активації, про що свідчить посилення кровопостачання [1]. Разом із тим

в останні роки з'являється все більше даних і про підвищення потужності деяких частотних складових  $\alpha$ -діапазону при функціональних навантаженнях [7, 8, 13, 16, 18, 19].

Зважаючи на те, що максимальний спектральний пік  $\alpha$ -ритму ЕЕГ або індивідуальна частота  $\alpha$ -активності є жорстко детермінованою генетичною ознакою, вкрай важливим є з'ясування питання, як саме змінює функціонування мозку виконання рухових навичок у відповідь на дію певних сигналів у обстежуваних із різною вихідною індивідуальною частотою  $\alpha$ -ритму ЕЕГ. Це є надзвичайно цікавим як із теоретичної точки зору, оскільки торкається фундаментальних питань нейрофізіологічного забезпечення цілеспрямованих рухів руки людини, так і з точки зору практичного застосування. Річ у тім, що сучасна людина і у повсякденному житті, і в своїй трудовій діяльності великою мірою здійснює саме такі рухи. В звичайних умовах їх виконання супроводжується дією навантажень різного роду, які загалом створюють ускладнюючий ефект. Усе це і визначило те, що метою нашого дослідження була оцінка за значеннями потужності коливань ЕЕГ у  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - і  $\alpha_3$ -піддіапазонах інтеграції висхідних і низхідних активаційних процесів у корі в осіб із різною індивідуальною частотою  $\alpha$ -активності при здійсненні заданих мануальних рухів без та із силовим навантаженням.

## МЕТОДИКА

У роботі як обстежувані брали участь 104 чоловіки-добровольці віком від 19 до 21 року, які до цього не мали черепно-мозкових травм. До вибірки були включені лише особи з правобічним профілем мануальної та слухової асиметрії. Мануальну та слухову асиметрію кожного чоловіка визначали за характером відповідей при виконанні моторних і психоакустичних проб, розраховуючи їх індивідуальні коефіцієнти ( $K_{ac.}$ ) [3]:

$$K_{ac.} = \frac{\sum_{np.} - \sum_{лів.}}{\sum_{np.} + \sum_{лів.}} \times 100\%$$

де  $K_{ac.}$  – індивідуальний коефіцієнт мануальної та слухової асиметрії;  $\sum_{np.}$  – сума завдань, при виконанні яких домінує права рука (праве вухо),  $\sum_{лів.}$  – сума завдань, при виконанні яких домінує ліва рука (ліве вухо).

У всіх чоловіків такі коефіцієнти мали позитивне значення і були вищим за 50 %.

Обстеження проводили в першій половині дня. Профіль асиметрії оцінювали за 30 хв. до початку реєстрації ЕЕГ. Під час запису ЕЕГ обстежувані знаходились у звуко- та світлонепроникній кімнаті із заплученими очима, у положенні напівсидячи в кріслі з підголовником. Передпліччя були зафіксовані на підлокотниках. Для спостереження за станом та реакціями чоловіків використовували систему відеомоніторингу з інфрачервоним підсвітленням.

Для кожного обстежуваного вся експериментальна процедура послідовно включала наступні етапи: реєстрації ЕЕГ в стані функціонального спокою (фон; I етап), при сенсомоторній діяльності в контрольному режимі (II етап), а також із силовим навантаженням (III етап).

Тривалість кожного з етапів була 40 с, між етапами для відпочинку обстежуваного й унеможливлення розвитку явищ монотонії робили перерву на 1 хв. Протягом цього часу проводили інструктаж про його дії в наступній експериментальній ситуації. Задля виключення крайових ефектів реєстрацію ЕЕГ під час усіх тестових проб починали через 15 с після початку діяльності та припиняли за 5 с до її завершення.

Як звукові стимули використовували електронну версію барабанного бою (програмне забезпечення Finale 2006). Стимули подавали бінаурально за допомогою чотирьох колонок, які знаходились у різних кутках кімнати на відстані 1,2 м від правого та лівого вух обстежуваного. Тривалість стимулу була 140 мс, гучність на виході колонок не перевищувала 55–60 дБ (визначали за допомогою шумоміра DE-3301). Гучність звуку додатково регулювали індивідуально

для кожного обстежуваного до досягнення комфортного рівня. Темп подання звукових стимулів на всіх етапах дослідження був однаковим і становив 2 Гц ( $120 \text{ хв}^{-1}$ ).

Під час II і III етапів експерименту у відповідь на кожний звуковий сигнал обстежувані по чергово стискали і розтискали пальці кисті правої руки з визначеною частотою – один цикл стискання і розтискання за секунду. В контрольному режимі (II етап) відповідне мануальне реагування чоловіки здійснювали без зусилля, на етапі застосування силового навантаження (III етап) – додатково утримували напівзигнутими пальцями гантель масою 2 кг.

ЕЕГ реєстрували монополярно за допомогою апаратно-програмного комплексу „Нейроком” (Україна, Харків, свідоцтво про державну реєстрацію № 6038/2007, дійсне до 18.04.2014 р.) у симетричних лобових (F1 і F2, F3 і F4), скроневих (T3 і T4, T5 і T6), центральних (C3 і C4), тім'яних (P3 і P4) і потиличних (O1 і O2) відведеннях за міжнародною системою 10–20 %. Референтним був об'єднаний вушний електрод. Тривалість кожної функціональної проби була 40 с. Для видалення ЕЕГ-артефактів використовували процедуру аналізу незалежних компонент (Independent Component Analysis (ICA)

аналіз). У безартефактних відрізках ЕЕГ за допомогою швидкого перетворення Фур'є (епоха аналізу 5,12 с, перекриття епох – 87,5 %, кількість епох в окремій реалізації – не менше ніж 20) визначали потужність коливань як квадрат їх амплітуди (мікрівольт у квадраті) у  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ - і  $\alpha 3$ -піддіапазонах. Межі таких частотних піддіапазонів ЕЕГ визначали індивідуально за методиками [11, 16]. Для цього в кожного обстежуваного в кожному відведенні ЕЕГ в стані функціонального спокою при заплюснених очах визначали максимальний спектральний пік  $\alpha$ -ритму ЕЕГ. Його значення усереднювали в усіх відведеннях, одержану величину вважали індивідуальною  $\alpha$ -частотою обстежуваного (individual alpha-frequency, IAF, Гц). У всіх чоловіків обраховували медіану IAF, яка дорівнювала 10,04 Гц. За її величиною було сформовано групи з високою ( $IAF \geq 10,04$ ,  $n = 51$ ) і низькою ( $IAF < 10,04$ ,  $n = 53$ ) IAF.

Межі частотних діапазонів визначали індивідуально, виходячи зі значення IAF обстежуваного. Використовували такий алгоритм [11, 16]: у правий бік від IAF з кроком у 2 Гц відкладали верхню межу  $\alpha 3$ -піддіапазону. Зліва під піку з кроком у 2 Гц визначали нижню межу  $\alpha 2$ -, в 4 Гц –  $\alpha 1$ -частот (таблиця).

Межі піддіапазонів  $\alpha$ -ритму електроенцефалограми (Гц) у чоловіків

Піддіапазон $\alpha$ -ритму електроенцефалограми	Рівень індивідуальної $\alpha$ -частоти	
	низький	високий
$\alpha 1$	$5,72 \pm 0,04 - 7,72 \pm 0,04$	$6,33 \pm 0,03 - 8,33 \pm 0,03$
$\alpha 2$	$7,73 \pm 0,04 - 9,73 \pm 0,04$	$8,34 \pm 0,03 - 10,34 \pm 0,03$
$\alpha 3$	$9,74 \pm 0,04 - 11,74 \pm 0,04$	$10,35 \pm 0,03 - 12,35 \pm 0,03$

Потужність коливань ЕЕГ у піддіапазонах  $\alpha$ -ритму в межах виділених груп чоловіків усереднювали для кожного відведення й для кожної проби.

Нормальність розподілу результатів досліджуваних вибірок перевіряли за допомогою програмного забезпечення “Microsoft Excel” через обрахування функції «Скос»:

$$A \approx \frac{1}{ns^3} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^3$$

та, «Ексцес»:

$$E \approx \frac{1}{ns^4} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^4 - 3$$

Функція «Скос» відображає асиметрію розкиду результатів, що характеризує ступінь



їх несиметричності щодо середніх значень. Функція «Екссес» характеризує відносну загостреність або згладженість фактичного розподілу порівняно з нормальним. Нормальним вважали розподіл результатів у виборці при змінах значень функцій «Екссес» та «Скос» у діапазоні від 2,0 до -2,0. Виходячи з результатів перевірки було встановлено, що всі досліджувані нами вибірки мали нормальний розподіл, оскільки значення функції «Екссесу» та «Скосу» не перевищували 2,0 і не були нижчими від -2,0.

Статистичну оцінку достовірності змін потужності  $\alpha$ -піддіапазонів ЕЕГ визначали за усередненими даними порівняно з фоном та іншими тестами за допомогою критерію  $t$  Стюдента (програмне забезпечення Microsoft Excel). Локалізацію й поширеність змін у корі визначали візуально за схематичними топокартами.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз отриманих результатів показав, що в обстежуваних із високою IAF виконання сенсомоторної діяльності в контрольному режимі під час II етапу експерименту супровод-

жується локальним зниженням потужності  $\alpha 1$ -піддіапазону ЕЕГ у лівій тім'яній частці ( $P \leq 0,05$ ),  $\alpha 2$  – в лівих скроневій, центральній і тім'яній частках ( $P \leq 0,05$ ) порівняно зі станом спокою. При цьому  $\alpha 3$ -активність блокується у переважній більшості ділянок кори ( $P \leq 0,05$ ,  $P \leq 0,001$ ; рис. 1, 2, 3, 1-2). Виходячи із теоретичних уявлень [2, 5, 8, 12, 18] такі зміни чітко вказують на посилення висхідних активаційних процесів, що може бути пов'язане, перш за все, з обробкою сенсорних стимулів, аніж реалізацією й програмуванням автоматизованої моторики. При цьому блокування  $\alpha$ -ритму ЕЕГ у паріетальних ділянках, можливо, більше пов'язано з оцінкою просторового розподілу сенсорних впливів і контролем власних рухів [4, 5, 8]. Закономірним є збільшення значущості й поширеності означених змін у корі в межах  $\alpha$ -ритму зі зростанням частоти коливань ЕЕГ (від  $\alpha 1$  до  $\alpha 3$ ). Саме у високочастотній смузі цього діапазону посилюється вплив із боку неспецифічних активуючих систем ретикулярної формації стовбура головного мозку [10, 14]. Відзначається локальна синхронізація  $\alpha 1$ -активності в передніх та правій латеральній лобових ділянках ( $P \leq 0,05$ ; див.

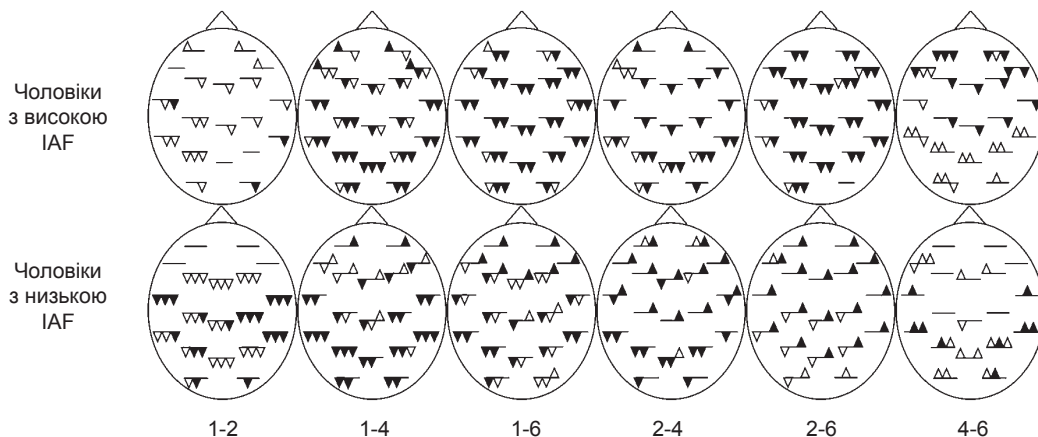


Рис. 1. Зміни потужності коливань електроенцефалограми в  $\alpha 1$ -піддіапазоні під час сенсомоторної діяльності різної складності в чоловіків із високою (а) та низькою (б) рівнями індивідуальної  $\alpha$ -частоти: 1 – стан функціонального спокою, 2 – сенсомоторна діяльність у контрольному режимі; 3 – сенсомоторна діяльність із застосуванням силового навантаження;  $\Delta \nabla$  зростання (зниження) показників у другому тесті,  $0,001 < P \leq 0,05$ ;

$\blacktriangle \blacktriangledown$  зростання (зниження) показників у другому тесті,  $P \leq 0,001$

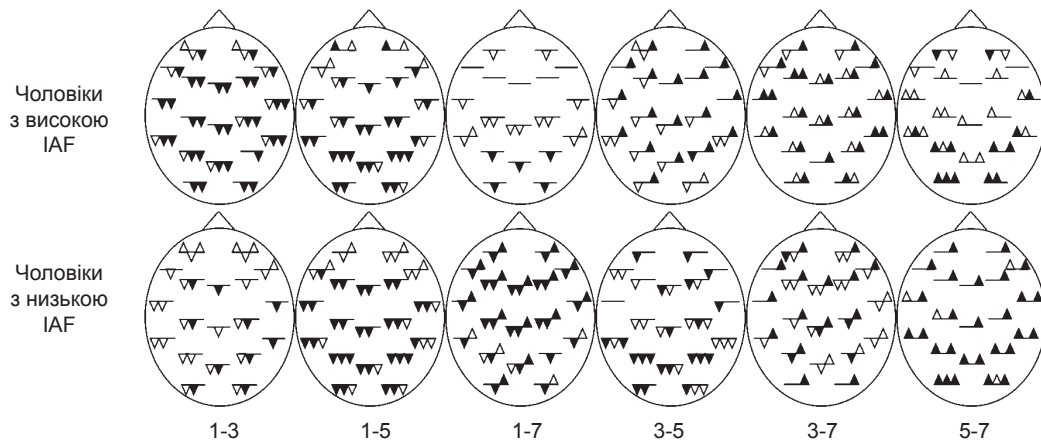


Рис. 2. Зміни потужності коливань електроенцефалограми в  $\alpha 2$ -піддіапазоні під час реалізації сенсомоторної діяльності різної складності в чоловіків із високим (а) та низьким (б) рівнями індивідуальної  $\alpha$ -частоти. 1 – стан функціонального спокою, 2 – сенсомоторна діяльність у контрольному режимі; 3 – сенсомоторна діяльність із застосуванням силового навантаження;

△ зростання (зниження) показників у другому тесті,  $0,001 < P \leq 0,05$ ;

▲ зростання (зниження) показників у другому тесті,  $P \leq 0,001$

рис. 1, 1–2). Це є індикатором збільшення рівня вибіркової уваги чоловіків цієї групи під час виконання завдання й полегшення низхідних потоків імпульсів із фронтальної зони на інші ділянки кори і таламічні структури [13, 16]. Формування фронто-таламічної системи вибіркової уваги сприяє посиленню взаємодії окремих мозкових структур у процесі спеціалізованої діяльності [7, 10], а також дає змогу сфокусувати кіркові процеси на вирішення поточної значимої задачі [7, 16]. Більш інтенсивні процеси уваги до релевантної діяльності забезпечують швидшу і простішу реалізацію завдання [10].

У чоловіків із низькою IAF індукована рухова активність викликає генералізоване зменшення потужності коливань ЕЕГ в усій  $\alpha$ -частотній смузі майже в усіх ділянках кори ( $P \leq 0,05$ ). Особливо таке пригнічення  $\alpha$ -активності характерним є для скроневих, центральних і тім'яних часток кори обох півкуль ( $P \leq 0,001$ ; див. рис. 1, 2, 3, 1–2). Характерно, що процеси депресії  $\alpha$ -коливань ЕЕГ в цій групі обстежуваних були сильнішими і більш широкими, ніж у чоловіків із високою IAF. Загалом це може свідчити про значну роль неспецифічної висхідної активації кори головного мозку [1, 5, 12] як

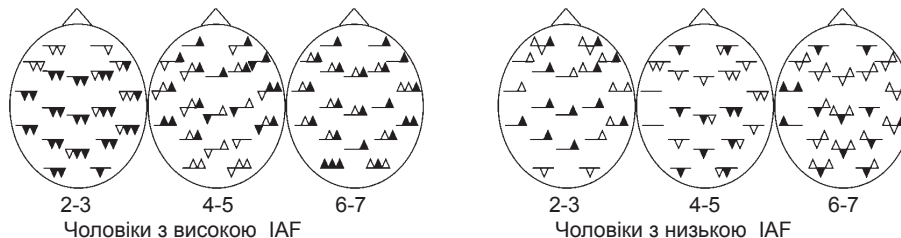


Рис. 3. Зміни потужності коливань електроенцефалограми в  $\alpha 3$ -піддіапазоні під час реалізації сенсомоторної діяльності різної складності в чоловіків із високим (а) та низьким (б) рівнями індивідуальної  $\alpha$ -частоти: 1 – стан функціонального спокою, 2 – сенсомоторна діяльність у контрольному режимі; 3 – сенсомоторна діяльність із застосуванням силового навантаження;

△ зростання (зниження) показників у другому тесті,  $0,001 < P \leq 0,05$ ;

▲ зростання (зниження) показників у другому тесті,  $P \leq 0,001$

основного механізму обробки інформації в умовах звичної сенсомоторної діяльності у цій групі обстежуваних.

Застосування силового навантаження під час сенсомоторної діяльності (III етап експерименту) в чоловіків із високою IAF пов'язане із широким та значним зниженням потужності  $\alpha 2$ - і  $\alpha 3$ -піддіапазонів ЕЕГ загалом у корі ( $P \leq 0,001$ ),  $\alpha 1$  – у лівій тім'яно-потиличній зоні та правому передньому скроневому відведенні ( $P \leq 0,05$ ) порівняно зі станом спокою (див. рис. 1, 2, 3, 1–3). Потужність  $\alpha 1$ -активності зростає в лівій передній лобовій ділянці ( $P \leq 0,05$ ; див. рис. 1, 1–3). Реалізація цього завдання супроводжується нижчою потужністю  $\alpha 1$ -піддіапазону в правій лобовій і лівій потиличній частках ( $P \leq 0,05$ ),  $\alpha 2$ - та  $\alpha 3$ -піддіапазонів – загалом у корі ( $P \leq 0,001$ ), ніж у контролі (див. рис. 1, 2, 3, 2–3). Така динаміка вказує на посилення, передусім, активаційних явищ у корі за умови застосування силового навантаження в чоловіків цієї групи.

У чоловіків із низькою IAF фіксується депресія  $\alpha 1$ - і  $\alpha 2$ -піддіапазонів ЕЕГ загалом у корі ( $P \leq 0,05$ ,  $P \leq 0,001$ ), переважно лівої півкулі, порівняно зі станом спокою (див. рис. 1, 2, 1–3). Динаміка  $\alpha 3$ -активності відзначається вагомим зростанням показників у симетричних лобових ( $P \leq 0,001$ ), правих центральній та потиличній частках ( $P \leq 0,05$ ; див. рис. 3, 1–3). Установлюється нижча потужність  $\alpha 1$ -піддіапазону ЕЕГ у центральних і задніх відділах кори з акцентом у лівій півкулі ( $P \leq 0,05$ ), ніж під час діяльності в контрольному режимі (див. рис. 1, 2–3). Натомість виявляється істотне зростання показників у  $\alpha 2$ -піддіапазоні у правій потиличній частці ( $P \leq 0,05$ ),  $\alpha 3$ -активності – загалом корі ( $P \leq 0,001$ ; див. рис. 2, 3, 2–3). Збільшення потужності  $\alpha 3$ -частотної смуги може відображати актуалізацію селективних і мнестичних процесів [10, 14, 16]. На нашу думку, вони забезпечують зіставлення аферентних інформаційних потоків про нові параметри роботи працюючих м'язів із

низхідними імпульсами з боку фронтальної кори про стару програму (модель) діяльності, що зберігається у робочій пам'яті і пов'язана із рухами у контрольному режимі. За даними Іоффе [4] в процесі виконання незвичних рухів у моторній корі формується програма, що включає два компоненти: рисунок нової координації та рисунок спеціалізованих низхідних впливів про стару установку, що забезпечують гальмування і заважають реалізації нових координацій. Синхронізація  $\alpha$ -коливань, на думку Костандова [7], відіграє важливу координуючу роль у формуванні пластичних властивостей установки, в своєчасному її гальмуванні, якщо вона переставє відповідати новим стимулам. Таким чином, синхронізація  $\alpha 3$ -активності у корі, виявлена в наших дослідженнях, може бути механізмом полегшення гальмування старої програми (моделі) діяльності і зміни її на нову. Слід зазначити за цих умов і розвиток локальної синхронізації  $\alpha 2$ -активності у правій потиличній частці, що, очевидно, є показником розвитку додаткових гальмівних впливів із боку кори [8] при збільшенні м'язового зусилля й утруднення реалізації рухів. Така специфіка кіркових динамічних процесів під час реалізації діяльності очевидно вказує на більшу суб'єктивну складність завдання для чоловіків цієї групи, більшу інертність їх нервових процесів та необхідність залучення додаткових механізмів обробки інформації для його реалізації.

Спостерігалися міжгрупові відмінності потужності  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ - та  $\alpha 3$ -піддіапазонів ЕЕГ під час сенсомоторної діяльності різної складності в чоловіків. Чоловіки із високою IAF характеризуються нижчою потужністю  $\alpha 1$ - й  $\alpha 2$ -піддіапазонів ЕЕГ по всьому скальпу ( $P \leq 0,001$ ) у всіх тестових ситуаціях порівняно з особами з низькою IAF (рис. 4). Значущість і поширеність означеної закономірності в  $\alpha 1$ -піддіапазоні загалом у корі, особливо в передніх структурах, є меншою ( $P \leq 0,05$ ,  $P \leq 0,001$ ). Чоловіки із низькою IAF відзначаються відносно нижчою потужністю

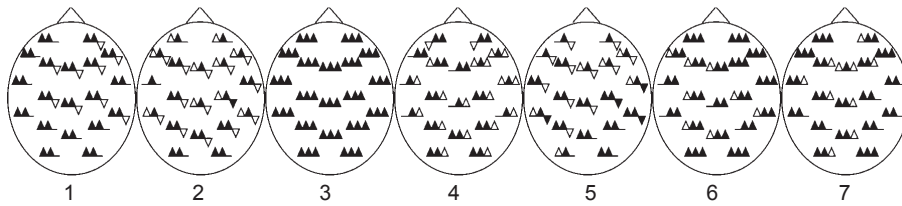


Рис. 4. Міжгрупові відмінності потужності коливань ЕЕГ в  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ - та  $\alpha 3$ - піддіапазонах у стані спокою та під час сенсомоторної діяльності різної складності в чоловіків;

▲▼ вищі (нижчі) показники в чоловіків із низьким рівнем індивідуальної  $\alpha$ -частоти, порівнюючи з особами із високим рівнем індивідуальної  $\alpha$ -частоти,  $0,001 < P \leq 0,05$ ;

▲▼ вищі (нижчі) показники в чоловіків із низьким рівнем індивідуальної  $\alpha$ -частоти, порівнюючи з особами із високим рівнем індивідуальної  $\alpha$ -частоти,  $P \leq 0,001$

$\alpha 3$ -піддіапазону по всьому скальпу ( $P \leq 0,05$ ) у спокої та під час сенсомоторної діяльності в контрольному режимі (див. рис. 4). Такі відмінності рівня потужності  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ - і  $\alpha 3$ -піддіапазонів ЕЕГ між групами чоловіків можуть указувати на статус відносно вищого активаційного тону кори, її готовності до активності і контролю інформаційних і мислительних процесів в осіб із високою IAF [1, 6, 9, 11, 16]. Натомість, застосування силового навантаження в обстежуваних із низькою IAF супроводжується порівняним зростанням потужності  $\alpha 3$ -активності загалом у корі ( $P \leq 0,05$ ,  $P \leq 0,001$ ), що може свідчити про специфіку їх реагування за цих умов.

Таким чином, результати наших досліджень висвітлюють характерні риси інтеграції висхідних (bottom-up) і низхідних (top-down) потоків нервових імпульсів як основи сенсорного сприйняття та реалізації моторики в групах обстежуваних. Виявлені особливості вихідного активаційного стану кори в чоловіків із різним рівнем IAF, очевидно, є передумовою формування в них відмінних стратегій селекції інформації під час реалізації сенсомоторної діяльності. Чоловіки з високою IAF характеризуються інтеграцією, з одного боку, більш економічних і локальних активаційних процесів у корі, з іншого, – низхідних впливів фронтальної зони в  $\alpha 1$ -піддіапазоні під час виконання завдань різної складності. Таке поєднання висхідних і низхідних впливів дає змогу активніше сфокусувати кіркові процеси на

вирішенні значимої задачі, полегшує взаємодію часток кори і може створювати умови для більш ефективної реалізації діяльності чоловіками цієї групи. Перехід до ускладненої сенсомоторної діяльності виявляється в певному посиленні висхідних активаційних впливів, що несуть інформацію про нові умови виконання завдання. Чоловіки з низьким рівнем IAF під час діяльності в контрольному режимі відзначаються вищою інтенсивністю неспецифічних висхідних процесів. За умов ускладнення діяльності фіксується посилення ролі низхідних потоків імпульсів в  $\alpha 2$ - і, особливо,  $\alpha 3$ -піддіапазонах, що забезпечують реалізацію механізмів полегшення гальмування старої програми (моделі) діяльності і зміни її на нову та відображають утруднення реалізації рухів із силовим навантаженням. Подібна специфіка кіркових динамічних процесів може свідчити про нижчу пластичність нервових процесів у чоловіків цієї групи, необхідність залучення додаткових механізмів обробки інформації та більшу суб'єктивну складність для них поставлених завдань. Ми припускаємо, що це створює підвищені вимоги до ресурсів нервової системи й, у кінцевому рахунку, може впливати на результуючу ефективність виконання завдань.

## ВИСНОВКИ

1. Виконання сенсомоторної діяльності різної складності в чоловіків із високим рівнем IAF супроводжується локальною активацією

окремих зон кори, тоді як у осіб із низьким рівнем IAF така активація набуває генералізованого характеру. Це може свідчити про те, що люди зі зниженим вихідним рівнем IAF витрачають на здійснення однієї й тієї самої рухової навички більше нервової енергії, ніж люди з високим рівнем IAF.

2. Чоловіки з високою IAF характеризуються інтеграцією процесів депресії  $\alpha$ -ритму переважно у задніх структурах кори та локальної синхронізації  $\alpha 1$ -активності у фронтальній зоні під час сенсомоторної діяльності різної складності. Застосування силового навантаження призводить до посилення явищ блокування  $\alpha$ -частотної ритміки.

3. Чоловіки з низькою IAF під час діяльності у контрольному режимі відзначаються високою інтенсивністю блокування всього частотного спектру  $\alpha$ -активності загалом у корі. За умови ускладнення діяльності фіксується порівняна синхронізація в  $\alpha 2$ - та, особливо,  $\alpha 3$ -піддіапазонах.

*Дослідження виконане за підтримки державного фінансування (реєстраційний номер 0111U002143).*

**А.Г. Моренко, О.С. Павлович, И.Я. Коцан**

#### **КОРКОВЫЕ АКТИВАЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ У МУЖЧИН С ВЫСОКОЙ И НИЗКОЙ ИСХОДНОЙ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ЧАСТОТОЙ А-РИТМА ВО ВРЕМЯ СЕНСОМОТОРНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ РАЗНОЙ СЛОЖНОСТИ**

В исследовании приняли участие 104 здоровых и праворуких мужчин в возрасте от 19 до 21 года, которые по значению медианы распределения усредненной во всех долях коры индивидуальной частоты  $\alpha$ -активности (IAF) были разделены на две группы – с высоким ( $n = 53$ ,  $IA \geq 10,04$  Гц) и низким ( $n = 51$ ,  $IAF \leq 10,03$  Гц) уровнями IAF. У мужчин с высоким уровнем IAF наблюдаются более экономичные и локальные активационные процессы в коре и нисходящие влияния фронтальной зоны, что, вероятно, является механизмом облегчения взаимодействия долей коры. Мужчины с низким уровнем IAF отличаются более высокой интенсивностью применения неспецифических активационных стратегий. Это свидетельствует о большой субъективной сложности для них поставленных заданий и привлечение дополнительных механизмов для обработки информации.

**Ключевые слова:** индивидуальная частота  $\alpha$ -ритма, сенсомоторная деятельность, мощность колебаний электроэнцефалограммы.

**A.G. Morenko, O.S. Pavlovich, I.Ya. Kotsan**

#### **FEATURES OF CORTICAL ACTIVATION PROCESSES IN MEN DURING AUDITORIMOTOR ACTIVITY OF DIFFERENT COMPLEXITY**

104 health right-handers men at the age 17–21 y.o. were tested in the study. Based on the average value of the median distribution in all parts of the cortex of individual  $\alpha$  frequency activity (IAF), men were divided into two groups: with high ( $n = 53$ ,  $IAF \geq 10,04$  Hz) and low ( $n = 51$ ,  $IAF < 10,04$  Hz) levels of IAF. In men with high levels of IAF, we observed more economical and local processes ascending nonspecific activation in the cortex and descending influences of the frontal zone, which is probably a mechanism to facilitate interaction between parts of the cortex. Men with the low levels of IAF have a higher intensity of use of non-specific activation strategies indicating greater subjective difficulties of targets and the involvement of additional mechanisms for information processing.

**Key words:** individual  $\alpha$ -rhythm frequency, sensorimotor activity, power of the electroencephalogram fluctuations.

*Lesia Ukrainka Eastern European National University*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Базанова О.М. Современная интерпретация альфа-активности электроэнцефалограммы // Успехи физиол. наук. – 2009. – **40**, № 3. – С. 32–53.
2. Бондарь А.Т. Исследование тонкой структуры спектра альфа-диапазона ЭЭГ при сенсомоторном поведении // Физиол. человека. – 1988. – **14**, № 2. – С. 179–185.
3. Брагина Н.Н., Доброхотова Т.А. Функциональные асимметрии человека. – М.: Медицина, 1981. – 288 с.
4. Иоффе М.Е. Мозговые механизмы формирования новых движений при обучении: эволюция классических представлений // Журн. высш. нервн. деятельности. – 2003. – **53**, № 1. – С. 5–21.
5. Лурия А.Р. Высшие корковые функции человека и их нарушения при локальных поражениях мозга. 3-е изд. – М.: Академ. проект, 2000. – 512 с.
6. Каплан А.Я., Борисов С.И. Динамика сегментных характеристик альфа-активности ЭЭГ человека в покое и при когнитивных нагрузках // Журн. высш. нервн. деятельности. – 2003. – **53**, № 1. – С. 22–32.
7. Костандов Э.А. Влияние контекста на пластичность когнитивной деятельности // Физиология человека. – 2010. – **36**, № 5. – С. 19–28.
8. Пономарев В.А., Кропотова О.В., Поляков Ю.И. Десинхронизация и синхронизация ЭЭГ подростков,



- вызванные стимулами, запускающими и запрещающими сенсомоторную реакцию. Сообщение II. Особенности при синдроме дефицита внимания и гиперактивности // Там же. – 2000. – **26**, № 3. – С. 261–268.
9. Умрюхин Е.А., Коробейникова И.И., Каратыгин Н.А. Успешность выполнения тестовых заданий студентами с различными спектральными характеристиками  $\alpha$ -ритма фоновой электроэнцефалограммы // Там же. – 2009. – **35**, №5. – С. 33–39.
  10. Фингелькурц А.А. Пространственно-временная организация сегментной структуры ЭЭГ человека : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М.: МГУ, 1998. – 66 с.
  11. Angelakis E., Lubar J.F., Stathopoulou S. Peak alpha frequency: an electroencephalographic measure of cognitive preparedness // Clin. Neurophysiol. – 2004. – № 115. – P. 887–897.
  12. Bazar E., Schürmann M. Alfa rhythms in the brain: functional correlates // New Physiol. Sci. – 1996. – 11. – P. 90.
  13. Deco G., Schürmann B. A. Neuro-cognitive visual system for object recognition based on testing of interactive attentional top-down hypotheses // Perceptin. – 2000. – **29**. – P. 1249.
  14. Fumoto M., Sato-Suzuki I., Mohri Y., Hideho A. Appearance of high-frequency alpha band with disappearance of low-frequency alpha band in EEG is produced during voluntary abdominal breathing in an eyes-closed condition // Neurosci. Res. – 2004. – **50**, № 3. – P. 307–317.
  15. Greicius M/D., Krasnow B., Reiss A.L., Moenon V. Functional connectivity in the resting brain: a net-work analysis of the default mode hypothesis // Prec. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – **100** (1). – P. 253–258;
  16. Klimesch W., Sauseng P., Hanslmayr S. EEG alpha oscillations: The inhibition–timing hypothesis // Brain Res. Rev. – 2007. – **53**. – P. 63–88.
  17. Mantini D., Perrucci M.G., Del Gratta C., Romani G.L., Corbetta M. Electrophysiological signatures of resting state network in the human brain // Prec.Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – **104** (32). – P. 13170–13175.
  18. Morenko A.G., Pavlovych O.S., Kotyk O.A., Vlasjuk S.S. Cortical Arousal Strategies in Left-handers during the Aural Perception and Manual Playback of Mono- and Polyphonic Rhythmical Patterns// J. Life Sci. – **6**. – P. 1408–1413.
  19. Zietsch B.P, Hansen J.L, Hansell N.K. Common and specific genetic influences on EEG power bands delta, theta, alpha, and beta / Biol Psychol. – 2007. – № 75(2). – P. 154–64.

*Східноєвроп. нац. ун-т ім. Лесі Українки*  
*E-mail: alevmore@gmail.com*

*Матеріал надійшов до*  
*редакції 20.02.2012*

О.Г. Родинський, О.Г. Зінов'єва, О.В. Мозгунов, О.С. Трушенко

## Активність інтернейронних пулів спинного мозку за умов експериментального цукрового діабету

*На щурах лінії Вістар з експериментальним цукровим діабетом (ЦД) і інтактних тваринах аналізували поріг, хронаксію, параметри потенціалу дорсальної поверхні (ПДП) спинного мозку (СМ). Виявлено зниження порога збудження на 41,4 % ( $P<0,05$ ), збільшення хронаксії на 9,5 % ( $P<0,01$ ), зростання амплітуди  $N_3$ -компонента на 15,8 % ( $P<0,05$ ), збільшення тривалості аферентного піку на 4,5 % ( $P<0,05$ ) і  $N_2$ -компонента на 10,9 % ( $P<0,01$ ). Зроблено висновок про те, що метаболічні зміни в умовах ЦД призводять до модифікації в активності аферентних шляхів і інтернейронного пулу СМ.*

*Ключові слова:* цукровий діабет, інтернейронний пул, потенціал дорсальної поверхні спинного мозку.

### ВСТУП

Проблема наслідків діабетичної невропатії (ДН), яка є одним з головних ускладнень цукрового діабету (ЦД), нині не втрачає свого значення, незважаючи на велику кількість досліджень [3, 9, 10]. Одним із симптомів ДН є невропатичний біль [14], який проявляється у вигляді алодинії чи гіперестезії, що дуже погіршує якість життя таких хворих [12, 14]. При цьому головна роль у розвитку больових відчуттів належить ураженню периферичних сенсорних волокон і дорсальних рогів спинного мозку (СМ) [14].

Розвиток невропатичного болю пов'язують з підсиленням вхідного ноцицептивного потоку чи нейрональної гіперактивності [12, 16]. Експериментально доведено, що вже на ранніх термінах (від 3 тиж до 12 міс тривалості гіперглікемії) від початку захворювання прогресує зниження швидкості проведення збудження та зміна амплітуди потенціалів дії різних типів волокон, що входять у дорсальний корінець СМ [14, 20, 23]. Суперечливі дані щодо змін електрофізіологічних показників СМ у дослідженнях з різною тривалістю захворювання на ЦД спонукали нас до більш детального вивчення процесів

збудження, які проходять у СМ тварин з експериментальним ЦД на ранніх строках розвитку гіперглікемії (1 міс). Такий підхід ґрунтується на тому, що у наших попередніх дослідженнях [3] за заданих умов було підтверджено наявність достовірних змін у периферичних структурах, зокрема нервово-м'язовому апараті.

Для аналізу вказаних процесів нами було обрано метод реєстрації потенціалу дорсальної поверхні (ПДП) СМ, оскільки це показник, який відображує активність роботи інтернейронів СМ у відповідь на подразнення аферентних волокон, зокрема активність пре- та постсинаптичних сегментарних і несегментарних нейронів СМ [5].

### МЕТОДИКА

Дослідження були проведені на 28 статевозрілих щурах лінії Вістар віком 6–8 міс, масою 180–240 г. ЦД моделювали одноразовим інтраперитонеальним введенням алоксану моногідрату («Sigma», США) у дозі 175 мг/кг після голодування тварин протягом доби при вільному доступі до води. Контроль вмісту глюкози крові проводили на 10-ту добу за допомогою глюкометра One Touch

Ultra. Для подальших досліджень відбирали тварин зі значеннями цього показника понад 15 ммоль/л. Тваринам контрольної групи одноразово вводили 0,1 мл 0,9%-го розчину NaCl. У гострий експеримент тварин брали на 30-ту добу після відтворення ЦД. Під тіопенталовим наркозом (50 мг/кг) виконували ламінектомію та розтин твердої мозкової оболонки. Після цього перерізуали СМ на рівні Th<sub>12</sub>-L<sub>1</sub> і заливали вазеліновою олією. Тварину витримували 3 год при температурному режимі 36–37 °С. Далі на центральну частину корінця L<sub>5</sub> накладали біполярні подразнювальні електроди, стимулювали цей відрізок прямокутними імпульсами тривалістю 0,3 мс та силою від 1 до 5 порогів (П), також використовували методику нанесення парних стимулів на дорсальний корінець СМ з інтервалом від 2 до 1000 мс. ПДП СМ відводили за допомогою монополярного кулькового срібного електрода у фокусі максимальної активності, референтний електрод при цьому розміщували на м'язах нижньої кінцівки [2]. Для подразнення використовували стандартну електрофізіологічну апаратуру, ПДП записували за допомогою аналого-цифрового перетворювача та персонального комп'ютера. Досліджували такі параметри ПДП: поріг, хронаксія, тривалість латентного періоду (ЛП), тривалість аферентного піку (АП), тривалості N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>-компонентів та Р-хвилі, загальну тривалість ПДП, а також амплітуди АП та N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>-компонентів і Р-хвилі відповідно.

Для обробки результатів використовували наступні методи варіаційної статистики:

розрахунок показників наочності у відсотках, середню арифметичну (М) та похибку середньої (m). Оцінку достовірності проводили за допомогою методів непараметричної статистики (критерій Манна–Уїтні). Зміни показників вважали достовірними при P<0,05. Експерименти з лабораторними тваринами відповідали етичним вимогам Європейської конвенції з використання хребетних тварин для експериментів. Евтаназію тварин по закінченні експерименту проводили введенням летальної дози тіопенталу натрію.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При дослідженні порогів виникнення ПДП СМ було встановлено, що за умов експериментального ЦД його значення зменшилося на 41,4 % (P<0,05, таблиця). Хронаксія ПДП СМ також відрізнялася від показників інтактної групи та була більшою на 9,5 % (P<0,01). З іншого боку, латентний період і тривалість ПДП суттєво не змінилися.

При характеристиці ПДП за умов супрамаксимальної стимуляції дорсального корінця СМ при розвитку ЦД (рис. 1) варто зазначити, що зміни амплітуди компонентів ПДП були різноспрямованими. Так, у порівнянні з інтактною групою амплітуда АП практично не змінилася, амплітуда N<sub>1</sub> і N<sub>2</sub>-компонентів зменшилася на 6,8 % і 7,3 % відповідно, а N<sub>3</sub>-компонента навпаки збільшилася на 15,8 % (P<0,05). Амплітуда Р-хвилі зменшилася на 23,2 %.

За експериментальних умов тривалість компонентів ПДП також змінювалася по-різ-

**Зміни основних показників потенціалу дорсальної поверхні спинного мозку тварин з експериментальним цукровим діабетом у порівнянні з інтактними тваринами**

Показник	Інтактна група	Цукровий діабет
Поріг, мВ	1,78 ± 0,07 (n = 14)	1,03 ± 0,25 (n = 12) *
Хронаксія, мкс	98,13 ± 3,89 (n = 16)	107,5 ± 4,75 (n = 12) **
Латентний період, мс	0,253 ± 0,018 (n = 16)	0,243 ± 0,014 (n = 12)
Тривалість потенціалу дорсдорсальної поверхні, мс	16,09 ± 0,77 (n = 16)	15,81 ± 0,96 (n = 12)

\* P < 0,05, \*\*P < 0,01 – достовірність порівняно з контролем.

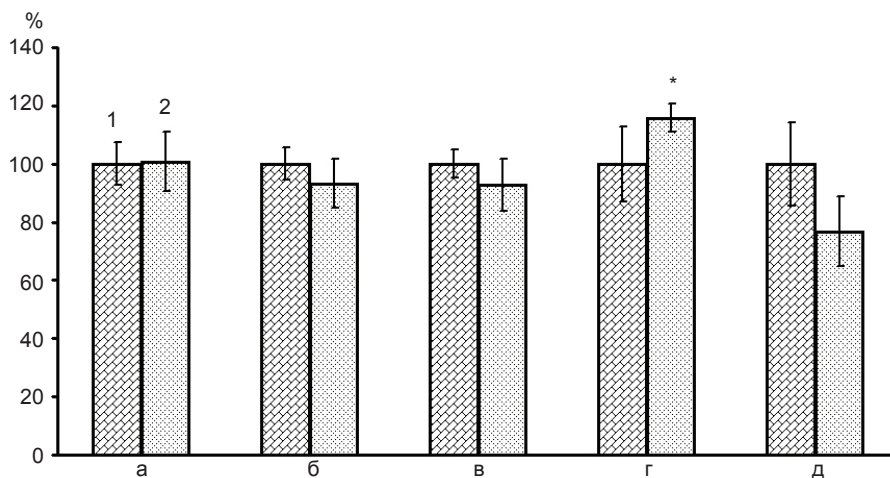


Рис. 1. Амплітуди аферентного піку (а),  $N_1$ - (б),  $N_2$ - (в) і  $N_3$ -компонента (г) та Р-хвилі (д) потенціалу дорсальної поверхні спинного мозку ( $n = 12$ ): 1 – інтактні тварини, 2 – тварини з експериментальним цукровим діабетом. \*  $P < 0,05$

ному (рис. 2). У порівнянні з інтактною групою тривалість АП збільшилася на 4,5 % ( $P < 0,05$ ),  $N_1$ - і  $N_3$ -компонента зменшилися на 7,2 і 16,2 %,  $N_2$ -компонента збільшилася на 10,9 % ( $P < 0,01$ ), а тривалість Р-хвилі практично не змінилася.

Для з'ясування змін деполяризації первинних аферентів СМ внаслідок процесів пресинаптичного гальмування в умовах експериментального ЦД було використано метод парної стимуляції [2]. При цьому на часовому проміжку від 4 по 8 мс ми дійсно спостерігали пригнічення  $N_1$ -компонента,

яке було більш виражене у групі тварин з експериментальним ЦД ( $P > 0,05$ ).

Слід відмітити зниження порога виникнення ПДП за експериментальних умов. За даними деяких дослідників [8, 19], дорсальні роги СМ відіграють важливу роль у підсиленні больової чутливості, адже сприймають полімодальну аферентацію, а гіперчутливість нейронів цих структур, в свою чергу, може викликати додатковий, підсилений, потік інформації, що сприяє виникненню алодії та гіперестезії за умов ЦД. Інші автори відзначають підвищену базальну активність

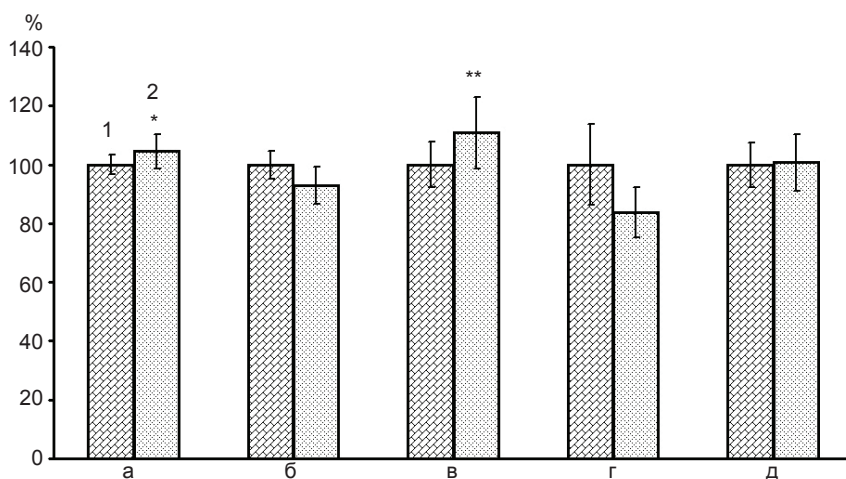


Рис. 2. Загальна тривалість аферентного піку (а),  $N_1$ - (б),  $N_2$ - (в),  $N_3$ -компонента (г) та Р-хвилі (д) потенціалу дорсальної поверхні спинного мозку ( $n = 12$ ): 1 – інтактні тварини, 2 – тварини з експериментальним цукровим діабетом. \*  $P < 0,05$  та \*\*  $P < 0,01$  – достовірність порівняно з контролем

нейронів дорсальних рогів СМ при ЦД [15]. Тож у таких умовах нейрони завчасно готові до сприйняття та передачі як больових, так і не больових стимулів, що сприймаються як больові – як у випадку з алодинією [12, 15]. Дослідники вказують на значну роль натрієвих каналів нейронів дорсальних рогів СМ, експресія яких за умов ЦД підвищується та збільшується вхідний потік  $\text{Na}^+$  всередину клітини, що, в свою чергу, призводить до зниження порога збудження [10, 15]. Деякі автори вказують на роль кальцієвих каналів як важливих підсилювачів сигналів у первинних сенсорних нейронах через збільшення потоку  $\text{Ca}^{2+}$  через них, що може призводити до підвищення їхньої збудливості [14].

Збільшення хронаксії, що спостерігалось у наших дослідженнях, опосередковано характеризує стан натрієвих каналів. Відомо, що функціонування нервової тканини відповідає закону сили-тривалості, при цьому зниження порога виникнення ПДП збігається з даними інших авторів [10], які описують збільшення експресії цих каналів при ЦД. Треба зазначити, що подібні зміни хронаксії не підтверджуються жодним із проаналізованих нами літературних джерел, та, ймовірно, вказують на збільшення кількості інактивованих натрієвих каналів або ж на зміни їх біофізичних властивостей, і тому потребують подальших досліджень.

При аналізі параметрів ПДП СМ нами було застосовано супрамаксимальну силу подразнення (5 П), якої достатньо для активації всіх низькопорогових аферентів [2]. За умов означеної сили стимуляції спостерігалось максимальне насичення ПДП, подальше збільшення інтенсивності подразнення не викликало підвищення амплітуди потенціалу.

Нами виявлено, що за умов експериментального ЦД достовірно ( $P < 0,05$ ) збільшувалася амплітуда тільки у  $\text{N}_3$ -компонента, який є постсинаптичним і віддзеркалює активність не сегментарних інтернейронів [5]. Експериментальний ЦД супроводжується підвищенням амплітуди збуджувальних постсинаптич-

них струмів, викликаних з дорсального корінця СМ [12], що пов'язують з підвищенням глутаматергічного входу у дорсальних рогах СМ через підвищення експресії  $\text{mGluR5}$  – метаболотропних глутаматних рецепторів 5-го типу у первинних аферентах, що, в свою чергу, сприяє підсиленню ноцицептивної передачі при діабетичній невропатії [12, 13].

Як відомо, АП – це компонент, що відображає сумарну хвилю збудження низькопорогових первинних аферентів [2, 6]. Встановлене нами збільшення тривалості АП, вочевидь, пов'язане з тим, що при ЦД більш за інші параметри зменшується швидкість проведення як у периферичному апараті, так і в центральних структурах [7, 9, 11]. Останнє пов'язано із залученням і немієлінізованих нервових волокон, і мієлінізованих, а також сенсорних провідників різних типів від різноманітних рецепторів [1, 4, 17, 20, 21].

Важливим є те, що дані щодо термінів захворювання лабораторних тварин, в яких відбуваються вищевказані зміни, неоднозначні та варіюють від кількох тижнів до місяців [20]. У дослідженнях *in vitro* [13] показано, що гіперосмолярні розчини глюкози знижують швидкість проведення як по волокнах А-типу, так і по С-типу (за умов гіперглікемії, спричиненої ЦД, спостерігається підвищення осмолярності плазми крові). Причиною такого зниження швидкості проведення може бути демієлінізація нервових волокон, яка виявляється при морфологічних дослідженнях при ЦД не лише в периферичних, але й у центральних структурах [18].

Деякі автори особливо відзначають, що головним чинником вищевказаних змін є оксидативний стрес, який впливає на всі тканини організму, зокрема структури СМ [17, 22], і може викликати мієлопатію, яка маніфестує переважно як сенсорна невропатія, що, в свою чергу, проявляється вже на ранніх етапах захворювання.

Що стосується збільшення тривалості  $\text{N}_2$ -компонента, який відображає постсинаптичну активність сегментарних інтернейро-



нів, то в її основі, вочевидь, також лежать вищевказані механізми.

Відсутність достовірних відмінностей у відновленні  $N_1$ -компонента при парному подразненні може свідчити про те, що метаболічні перетворення при ЦД не викликають змін пресинаптичного гальмування [2, 5].

У наших дослідженнях показано, що за умов експериментального ЦД відбуваються зміни у роботі нейронів дорсальних рогів СМ, що проявляється у зменшенні порога виникнення ПДП. Збільшення хронаксії ПДП свідчить про вірогідні зміни біофізичних якостей натрієвих каналів, а також більш детального вивчення.

Таким чином, можна зробити висновок, що метаболічні перетворення при ЦД призводять до зниження порога збудження та порушень у функціонуванні аферентних провідників та інтернейронного пулу СМ.

**А.Г. Родинський, Е.Г. Зинов'єва, А.В. Мозгунов, А.С. Трушенко**

#### **АКТИВНОСТЬ ИНТЕРНЕЙРОННЫХ ПУЛОВ СПИННОГО МОЗГА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА**

На крысах линии Вистар с экспериментальным сахарным диабетом (СД) и интактных животных анализировали порог, хронаксию, параметры потенциала дорсальной поверхности (ПДП) спинного мозга (СМ). Выявлено снижение порога возбуждения на 41,4 % ( $P<0,05$ ), увеличение хронаксии – 9,5 % ( $P<0,01$ ), возрастание амплитуды  $N_3$ -компонента – 15,8 % ( $P<0,05$ ), увеличение длительности афферентного пика – 4,5 % ( $P<0,05$ ) и  $N_2$ -компонента – 10,9 % ( $P<0,01$ ). Сделан вывод о том, что метаболические изменения в условиях СД приводят к модификации в активности афферентных путей и интернейронного пула СМ. Ключевые слова: сахарный диабет, интернейронный пул, потенциал дорсальной поверхности спинного мозга.

**O.G. Rodinsky, O.G. Zinovieva, O.V. Mozgunov, O.S. Trushenko**

#### **THE ACTIVITY OF THE INTERNEURON POOLS OF THE SPINAL CORD IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS**

We analyzed threshold, chronaxy and parameters of the potential of the dorsal surface (PDP) of the spinal cord (SC) in Wistar

rats with experimental diabetes mellitus (DM) and intact animals. We found a decrease in the excitation threshold by 41,4 % ( $P<0,05$ ), and an increase in chronaxia by 9,5 % ( $P<0,01$ ), an increase of the amplitude of the  $N_3$ -component by 15,8 % ( $P<0,05$ ), and an increase in the duration of the afferent peak by 4,5 % ( $P<0,05$ ) and the  $N_2$ -component by 10,9 % ( $P<0,01$ ) respectively. We conclude that the metabolic changes under DM lead to modification of activity of the afferent pathways and interneuron pool of SC.

Key words: diabetes mellitus, interneuronal pool, potential of the dorsal surface of the spinal cord.

*Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Public Health*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Костюк Е.П., Булгакова Н.В., Василенко Д.А. Характеристики проведения по афферентным нервным волокнам у мышей со стрептозотоцининдуцированным и генетически детерминированным диабетом // *Нейрофизиология*. – 1996. – **28**, № 4/5. – С.173–178.
2. Макий Е.А., Неруш П.А., Родинский А.Г. Параметры потенциала дорсальной поверхности спинного мозга крыс при экспериментальном гипертиреозе // *Нейрофизиология*. – 2001. – **33**, № 4. – С. 279–285.
3. Родинський О.Г., Зінов'єва О.Г., Мозгунов О.В. Електрофізіологічний аналіз збудливості нервово-м'язового комплексу за умов експериментального цукрового діабету // *Експерим. та клін. фізіологія і біохімія*. – 2012. – **59**, №3. – С.7–12.
4. Сивоус Г.И. Клиническая характеристика диабетической периферической полиневропатии у детей и подростков // *Врач*. – 2004. – №2. – С.43–45.
5. Флоров А.К. О происхождении потенциала дорсальной поверхности спинного мозга : Автореферат дисс. ...канд. биол. наук. – Днепропетровск, 1966. – 17 с.
6. Шугуров О.О., Шугуров О.О., Особливості відведення масових спинномозкових потенціалів поза спинним мозком // *Нейрофизиология*. – 1999. – **31**, №2. – С. 120–122.
7. Carsten R.E., Whalen L.R., Ishii D.N. Impairment of spinal cord conduction velocity in diabetic rats // *Diabetes*. – 1989. – **38**, №6. – P.730–736.
8. D'Mello R., Dickenson A. H. Spinal cord mechanisms of pain // *Brit. J. Anaesthesia*. – 2008. – 101, №1. – P. 8–16.
9. Kucera P., Goldenberg Z., Varsik P., Buranova D., Traubner P. Spinal cord lesions in diabetes mellitus. Somatosensory and motor evoked potentials and spinal conduction time in diabetes mellitus // *Neuroendocrinol. Let.* – 2005. – **26**, №2. – P.143–147.
10. Hong S., Morrow T.J., Paulson P.E., Isom L.L., Wiley J.W. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in tetrodotoxin-sensitive and -resistant sodium channels in dorsal root ganglion neurons in the rat // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**, №28. – P.29341–50.
11. Kennedy J.M., Zochodne D.V. The regenerative deficit of peripheral nerves in experimental diabetes: its extent,

- timing, and possible mechanisms // Brain. – 2000. – **123**, №12. – P. 2118–2129.
12. Li J.-Q., Chen S.-R., Chen H., Cai Y.Q., Pan H.L. Regulation of increased glutamatergic input to spinal dorsal horn neurons by mGluR5 in diabetic neuropathic pain // J. Neurochem. – 2010. – **112**, №1. – P.162–172.
  13. Matsuka Y., Spigelman I. Hyperosmolar solutions selectively block action potentials in rat myelinated sensory fibers: implications for diabetic neuropathy // J. Neurophysiol. – 2004. – **91**, №6. – P.48–56.
  14. Messinger R.B., Naik A.K., Jagodic M.M., Nelson M.T., Lee W.Y., Choe W.J., Orestes P., Latham J.R., Todorovic S.M., Jevtovic-Todorovic V. In-vivo silencing of the Cav3.2 T-type calcium channels in sensory neurons alleviates hyperalgesia in rats with streptozocin-induced diabetic neuropathy // Pain. – 2009. – **145**, №1-2. – P.184–195.
  15. Morgado C., Tavares I. C-fos expression at the spinal dorsal horn of streptozotocin-induced diabetic rats. // Diab. Metab. Res. Rev. – 2007. – **23**, №8. – P.644–652.
  16. Pertovaara A., Wei H., Kalmari J., Ruotsalainen M. Pain behavior and response properties of spinal dorsal horn neurons following experimental diabetic neuropathy in the rat: modulation by nitecapone, a COMT inhibitor with antioxidant properties. // Exp. Neurol. – 2001. – **167**, №2. – P.425–434.
  17. Schmeichel A.M., Schmelzer J.D., Low P.A. Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy // Diabetes. – 2003. – **52**, №12 – P.165–171.
  18. Selvarajah D., Wilkinson I.D., Emery C.J., Harris N.D., Shaw P.J., Witte D.R., Griffiths P.D., Tesfaye S. Early Involvement of the Spinal Cord in Diabetic Peripheral Neuropathy // Diabet. Care. – 2006. – **29**, №12. – P.2664 – 2669.
  19. Spruce M.C., Potter J., Coppini D.V. The pathogenesis and management of painful diabetic neuropathy: a review // Diabet. Med. – 2003 – **20**. – P.88–98.
  20. Terada M., Yasuda H., Kikkawa R., Koyama N., Yokota T., Shigeta Y. Electrophysiological study of dorsal column function in streptozocin-induced diabetic rats: comparison with 2,5-hexanedione intoxication // J. Neurol. Sci. – 1993. – **115**, №1. – P.58–66.
  21. Varsik P., Kucera P., Buranova D., Balaz M. Is the spinal cord lesion rare in diabetes mellitus? Somatosensory evoked potentials and central conduction time in diabetes mellitus // Med. Sci. Monit. – 2001. – **7**, №47. – P.712–715.
  22. Vincent A.M., Russell J.W., Low P., Feldman E.L. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy // Endocrin. Rev. – 2004. – **25**, №4. – P.612–628.
  23. Wang X.-L., Zhang H.-M., Chen S.-R., Pan H.L. Altered synaptic input and GABAB receptor function in spinal superficial dorsal horn neurons in rats with diabetic neuropathy // J. Physiol. – 2007. – **579**, №3. – P. 849–861.

Дніпропетров. мед. академія МОЗ України  
E-mail: zinovaeval@mail.ru

Матеріал надійшов  
до редакції 18.03.2013

Ж.О. Крученко, Н.О. Пількевич

## Вплив інтраназального введення дофаміну на когнітивні процеси та загальнорухову активність щурів при стресі

*У щурів лінії SHR вивчали вплив інтраназального введення дофаміну (ДА) на реалізацію харчового оперантного умовного рефлексу (ОУР) та загальнорухову активність у міжстимульний період у нормі та в умовах стресу. Реєстрували оперантні умовні реакції та загальні поведінкові феномени (завмирання, грумінг, стійки, локомоторну активність, міжсигнальні рухи у годівниці). Стан гострого стресу викликали нанесенням інтенсивного акустичного подразнення (гучний дзвінок, поданий під час здійснення ОУР). Стрес призводив до гальмування умовнорефлекторної діяльності, знерухомлення тварин у міжстимульний період, послаблення уваги до умовного сигналу та годівниці. На тлі інтраназальної аплікації ДА (0,15 мг/кг) стресорний ефект інтенсивного звукового подразнення нівелювався, не проявляючи гальмівного впливу на ОУР та загальнорухову активність. ДА, пригнічуючи реакції тривоги і страху, посилював концентрацію уваги, що сприяло поліпшенню інтегративної функції в конкретній ситуації виконання ОУР.*

*Ключові слова:* дофамін, інтраназальна аплікація оперантний умовний рефлекс, стрес, щури.

### ВСТУП

Дисфункції у дофамінергічній (ДА) системі відіграють суттєву роль у патогенезі низки неврологічних захворювань, зокрема хвороби Паркінсона (ХП) та синдрому гіперактивності із дефіцитом концентрації уваги (ADHD; від англ. Attention Deficit/Hyperactivity Disorder). Це супроводжується розладом рухової активності та порушенням з боку психічної сфери. Окрім цього уповільнюється темп розумової діяльності – брадифренія, яку вважають своєрідним аналогом моторної гіпокінезії і пояснюють обмеженістю робочого ресурсу когнітивних систем, насамперед систем уваги та оперативної пам'яті [16]. Також відомо, що ДА-системи мозку безпосередньо беруть участь у регуляції психоемоційного стресу. Останній є фактором ризику і може спровокувати клінічну маніфестацію ХП, а також посилювати симптоми ADHD. Є експериментальні підтвердження того, що ДА-системи залучені в нейрохімічні механіз-

ми ADHD, пов'язані із дисфункцією мезолімбічних відділів головного мозку [12, 13, 18, 20–22]. Компенсація загиблих нігрозтріальних нейронів може здійснюватися за рахунок перебудови ДА-метаболізму з посиленням активності нейронів, що залишилися, у стимулюванні синтезу ДА. Важливою проблемою при лікуванні психічних і неврологічних захворювань, зокрема ХП, є вибір шляхів введення препаратів. Найбільш ефективними є препарати леводопи – метаболічного попередника ДА, тому що сам він не проходить через гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ). Проте тривалий прийом леводопи перорально доволі часто призводить до важких ускладнень у вигляді дискінезій [3]. Першочерговою терапією для пацієнтів з ADHD вважається застосування D-амфетаміну та метилфеніда-ту, які значно покращують основні симптоми, але мають негативні наслідки [6, 7, 13]. Існують експериментальні свідчення того, що інтраназальна аплікація речовин може бути

шляхом до мішеней у центральну нервову систему [8, 11, 15, 23]. Однією з альтернатив постачання ДА у центральні структури мозку в обхід ГЕБ може бути інтраназальне його введення [9, 10].

Мета нашої роботи – визначення ефективності інтраназального методу підвищення вмісту ДА в ЦНС у щурів лінії SHR в моделі виконання оперантного умовного рефлексу (ОУР), яка дає змогу виявити рівень когнітивних процесів та загальнопорухової активності в нормі та при стресі.

## МЕТОДИКА

Досліди проведено на самицях щурів зі спонтанною гіпертензією лінії SHR масою 200-250 г (n= 12). Вивчали динаміку умовно-рефлекторної діяльності та загальноповедінкових рухових реакцій в експериментальній камері при виробленні та відтворенні харчового ОУР „рукості”: у відповідь на клацання (короткий звуковий стимул) здійснювати пошукові рухи кінцівкою у годівниці з їжею. Оцінювали рівень умовного рефлексу за відсотком пошукових рухів у відповідь на умовний подразник, який пред’являли з інтервалом 1 хв. Одночасно у міжстимульний період реєстрували загальнопорухові та поведінкові реакції: дослідницьку та локомоторну активність, наявність стійок (бали), завмирання та грумінг (секунди), міжсигнальні рухи кінцівкою у годівничці, обнюхування годівнички без пошукових рухів (бали). Стан стресу викликали гучним дзвінком, який подавали через 2 с після умовного сигналу і оцінювали за тривалістю завмирання (с), за відсотком проявлення умовного рефлексу до дзвінка, на фоні його дії та після відміни, за особливостями окремих показників загальнопорухових реакцій. На фоні виробленого умовного рефлексу інтраназально вводили ДА за 30 хв до початку експерименту в дозах 0,3 та 0,15 мг/кг і аналізували вищезгадані показники у порівнянні з контролем за допомогою програми „Призма”. Статистичну обробку

одержаних числових результатів включала в себе розрахунок середніх арифметичних  $\pm$  похибка середнього з використанням критерію t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У нормі умовнорефлекторна діяльність щурів характеризувалася нестабільністю та невисоким рівнем відтворення. Проявлення ОУР у відповідь на дію умовного сигналу становили  $65,0 \pm 8,2$  % (рис. 1, I, 1,). Гострий стрес повністю пригнічував цей показник ( $1,25 \pm 0,81$  %; див. рис. 1, I, 2). Після відміни дзвінка умовний рефлекс не відновився впродовж наступних 10 хв спостережень ( $45,0 \pm 8,23$  %; див. рис. 1, 3 I). Відомо, що рухова активність щурів характеризується певними особливостями. Дослідницька діяльність та локомоторна активність властива і для інших видів тварин, але щурам притаманні ще й такі стереотипні рухові прояви, як стійки, грумінг, чухання. Їхні рівні вважаються індексами, чутливими до ступеня тривожності: вони підвищуються або пригнічуються при дії страху та вважаються відповідними поведінковими

Рис. 1. Відносна кількість реалізацій оперантного умовного рефлексу у контролі та після інтраназальної аплікації дофаміну (ДА): 1 – до дзвінка, 2 – під час його дії, 3 – після припинення дії дзвінка (для усіх фрагментів); I – контроль, II – аплікація ДА

маркерами [4, 5]. У наших експериментах у контролі в міжстимульний період спостерігалися високий рівень локомоторної активності, стійок, підходів до годівниці (рис. 2, а, 1). Незважаючи на систематичну роботу, щури не адаптувалися до умов експерименту, проявляючи високу моторну активність. Інтенсивний дзвінок пригнічував загальнорухову активність – локомоцію та стійки (див. рис. 2, а, 2). Значне зниження у міжстимульний період рухів біля годівниці ( $1,96 \pm 0,30$  бала до дзвінка, та  $0,55 \pm 0,17$  бала – після,  $P < 0,001$ ; див. рис. 2, а, 1, 2) свідчить про гальмування харчової мотивації, викликане стресом. Особливо показовою була реакція завмирання. У контролі в міжстимульний період тварини були активними і завмирання майже не спостерігалось (середня тривалість відповідних епізодів  $3,06 \pm 1,38$  с; рис. 3, I, 1). Дія дзвінка викликала знерухомлення, яке тривало май-

же весь міжстимульний час (у середньому  $47,75 \pm 4,07$  с, див. рис. 3, I, 2). За наступні 10 хв рухова активність повністю не відновлювалася (див. рис. 3, I, 3).

При інтраназальному введенні ДА найбільш ефективною щодо позитивного впливу на когнітивні процеси та загальнорухову активність була доза  $0,15$  мг/кг. Доза  $0,3$  мг/кг виявилася занадто високою, яка загальмувала поточну умовнорефлекторну діяльність та загальнорухову активність. Відмічено значне підвищення відсотка ОУР, викликане аплікацією ДА у дозі  $0,15$  мг/кг ( $65,0 \pm 8,2$  % – до та  $97,5 \pm 1,64$  % – на фоні ДА; див. рис. 1, II, 1), який перевищував вихідні значення. Це може свідчити про покращання оперативної (робочої) пам'яті. На тлі дії ДА гучний дзвінок не спричиняв свого гальмівного впливу на ОУР, і не викликав знерухомленості (див. рис. 3, II, 2). Навпаки, збільшувалася кількість підходів

Рис. 2. Характеристика рухової активності в міжстимульний період до (а) та після (б) аплікації дофаміну (ДА): 1 – до дзвінка, 2 – під час його дії, 3 – після припинення дії дзвінка (для усіх фрагментів); I – локомоція, II – стійки, III – обнюхування годівниці



до годівнички (див. рис. 2,б, II, 2), що дає підставу стверджувати про підвищення уваги. Показано [17], що інтраназальна аплікація ДА знижує загальнорухову активність та покращує увагу у щурів лінії NHE, яка вважається нормотензивним мезокортикальним варіантом ADHD. Щури лінії SHR із генетично зумовленою гіпертензією та вираженим ADHD являють собою придатну модель для вивчення механізмів гіперактивності і дефіциту концентрації уваги. Розроблена нами модель гострого стресу, створеного зіткненням позитивної харчової мотивації, викликаного дією умовного подразника, та страху, спричиненого гучним дзвінком за умов виконання ОУР, дає можливість визначити ступінь пошкодження оперативної робочої пам'яті та загальнорухової активності. Дія стресу є одним із факторів, що підсилюють нейропсихічні порушення при ХП та ADHD [1, 2]. Встановлено, що стрес викликає у щурів розлад просторової пам'яті внаслідок префронтальної ДА-дисфункції [16]. ДА-системи мозку безпосередньо беруть участь у регуляції емоційного стану та механізмах психоемоційного стресу [14]. Таким чином, одержані нами результати дають можливість

ствержувати, що підвищення вмісту ДА у мозку щурів лінії SHR за допомогою інтраназальної аплікації в дозі 0,15 мг/кг нівелює стрес, викликаний гучним дзвінком, знижуючи рівень страху та тривоги, що сприяє концентрації уваги. Це дає можливість тварині адекватно оцінювати сигнали, про що свідчить покращення інтегративних функцій у ЦНС у парадигмі виконання конкретного ОУР. Цим можна пояснити підвищення відсотка умовного рефлексу, що перевищує контрольні значення до та на тлі дії стресу.

У стратегії лікування нейродегенеративних захворювань слід прийняти до уваги зворотну характер пошкодження частини нейронального пулу, що створює перспективи для можливості відновлення тимчасово втраченої ДА-функції нейронів. Природні механізми захисту, відновлення та компенсації функції визначають підходи до профілактики та терапії таких нейродегенеративних захворювань, як ХП та ADHD. Головною ланкою патогенетичної терапії є підтримання пулу збережених ДА-нейронів та вмісту ДА в нігрозтріальних нейронах. Одним із варіантів підвищення вмісту ДА у ЦНС може стати його інтраназальна аплікація в обхід ГЕБ.

**Ж.О. Крученко, Н.О. Пількевич**

### **ВЛИЯНИЕ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ДОФАМИНА НА КОГНИТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ И ОБЩЕДВИГАТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ КРЫС ПРИ СТРЕССЕ**

У крыс линии SHR изучали влияние интраназального введения дофамина (ДА) на реализацию пищевого оперантного условного рефлекса (ОУР) и общедвигательную активность (локомоция, стойки, замирание, груминг) в межстимульный период в норме и в условиях стресса. Состояние острого стресса вызывали нанесением интенсивного акустического раздражения – громкий звук, действующий во время осуществления ОУР. Стресс вызывал торможение условнорефлекторной деятельности, обездвигивание животных, ослабление внимания к условному стимулу и кормушке. На фоне интраназальной аппликации ДА (0,15 мг/кг) стрессорный эффект звукового раздражения нивелировался, не оказывая тормозного влияния на ОУР и общедвигательную активность. ДА, угнетая реакции тревоги и страха, усиливал концентрацию внимания,

Рис. 3. Тривалість завмирання щурів після аплікації дофаміну (ДА): 1 – до дзвінка, 2 – під час його дії, 3 – після припинення дії дзвінка (для усіх фрагментів); I – контроль, II – аплікація ДА

что способствовало улучшению интегративной функции в конкретной ситуации осуществления ОУР.

Ключевые слова: дофамин, интраназальная аппликация, оперативный условный рефлекс, двигательная активность, стресс, крысы.

**Zh.A.Kruchenko, N.A.Pilkewich**

# **INFLUENCE OF INTRANASAL ADMINISTRATION OF DOPAMINE ON REALIZATION OF COGNITIVE PROCESSES AND LOCOMOTOR ACTIVITY OF RATS DURING STRESS**

In spontaneously hypertensive rats (SHR) we studied the influence of intranasal administration of dopamine (DA) on realization of food operant conditioned reflex (OCR) and motor activity (locomotion, bars, stopping beating, grooming) in a interstimulation period in a norm and in the conditions of stressed influences. The state of sharp stress was caused by application of intensive acoustic irritation is a loud sound operating during realization of OCR. Stress caused a brake of conditioned reflex activity, immobilization of animals, weakening of attention to the conditional stimulus. On a background intranasal application DA (0,15 mgs/of kg) the effect of stress on voice irritation was eliminated, not rendering brake influence on OCR and motor activity. DA via oppressing the reactions of alarm and fear strengthened the focused attention that assisted the improvement of integrative function in the concrete situation of realization of OCR.

Key words: dopamine, intranasal administration operant conditioned reflex (OCR), motor activity, stress, rats.

*A.A. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv*

## **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.**

1. Вейн А.М., Голубев В.Л., Берзиньш Ю.Э. – Рига: Зинатне, 1981. – 362 с.
2. Голубев В.Л., Левин Я.И., Вейн А.М. Болезнь Паркинсона и синдром Паркинсонизма. – М.: Медпресс, 1999. – 416 с.
3. Крыжановский Г.Н., Карабань И.Н., Магаева С.В., Кучеряну В.Г., Карабань Н.В. Болезнь Паркинсона. – М.: Медицина, 2002. – 335 с.
4. Родина В.И., Крупина Н.А., Крыжановский Г.Н., Окнина Н.Ф. Многопараметровый метод комплексной оценки тревожно-фобических состояний у крыс // Журн. высш. нерв. деятельности. – 1993. – 43, №5. – С. 1006–1017.
5. Шовен Р. Поведение животных. – М.: Мир, 1972. – 489 с.
6. Advokat C. Update on amphetamine neurotoxicity and its relevance to the treatment of ADHD // J. Atten. Disord. – 2007. – 11. – P. 8–16.
7. Arnsten A.F. Stimulants: therapeutic actions in ADHD // Neuropsychopharmacol. – 2006. – 31. – P. 2376–2383.

*Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ*  
E-mail: kruzhan@mail.ru

8. Buddenberg T.E., Topic B., Mahiberg E.D., de Souza Silva M.A., Huston J.P., Mattern C. Behavioral actions of intranasal application of dopamine: effects on forced swimming, elevated plus-maze and open field parameters // Neuropsychobiol. – 2008. – 57. – P. 70–79.
9. Chemuturi N.V., Haraldsson J.E., Prisinzano T., Donovan M. Role of dopamine transporter (DAT) in dopamine transport across the nasal mucosa // Life Sci. – 2006. – 79. – P. 1391–1398.
10. Dahlin M., Jansson B., Bjork E. Levels of dopamine in blood and brain following nasal administration to rats // Eur. J. Pharm. Sci. – 2001. – 14. – P. 75–80.
11. Graff C.L., Pollack G.M. Nasal drug administration; potential for targeted central nervous system delivery // Pharm. Sci. – 2005. – 94. – P. 1187–1195.
12. Heijtz R.D., Kolb B., Forssberg H. Motor inhibitory role of dopamine D1 receptors: implications for ADHD // Physiol. Behav. – 2007. – 92. – P. 155–160.
13. Horst R.O., Hendren R.L. Integrated pharmacologic treatment of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) // Essend. Psychopharmacol. – 2005. – 6. – P. 250–261.
14. Huber S.J., Cummings J. Parkinson's disease. – Neurobehavioral Aspects. – New York: Oxford University Press, 1992. – 368 p.
15. Illum L. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system // Eur. J. Pharm. Sci. – 2000. – 11. – P. 1–18.
16. Kazushige M., Mitsutoshi Yuzurihara, Atsushi Ishige, Hiroshi Saaki, De-Hua Chui, and Takeshi Tabira. Chronic Stress induces impairment of spatial working memory because of prefrontal Dopaminergic Dysfunction // Y.Neurscience. – 2000. – 20, № 4. – P. 1568–1574.
17. Lucia A.Ruocco, Maria A. de Souza Silva, Blanca Topic. Intranasal application of dopamine reduces activity and improves attention in Naples High Excitability rats that feature the mesocortical variant of ADHD // Europ. Neuropsychopharmacol. – 2009 – 19. – P. 693–701.
18. Mehler-Wex C., Riederer P., Gerlach M. Dopaminergic dysbalance in distinct basal ganglia neurocircuits: implications for the pathophysiology of Parkinson's disease, schizophrenia and attention deficit hyperactivity disorder // Neurotox. Res. – 2006. – 10 – P. 167179.
19. Schwab R.S., Lieper Y. Effect of mood, motivation, stress, and alertness of the performance in Parkinson's disease // Psychiat. Neurol. (Basel). – 1965. – 150 – P. 345–357.
20. Sikstrom S., Soderlund G. Stimulus-dependent dopamine release in attention-deficit/hyperactivity disorder // Psychol. Rev. – 2007. – 114. – P. 1047–1075.
21. Sonuga-Barke E.J. The dual pathway model of AD/HD: an elaboration of neuro-developmental characteristics // Neurosci. Biobehav. Rev. – 2003. – 27 – P. 593–604.
22. de Souza Silva M.A., Topic B., Huston J.P., Mattern C. Intranasal dopamine application increases dopaminergic activity in the neostriatum and nucleus accumbens and enhances motor activity in the open field // Synapse. – 2008. – 62. – P.176–184.
23. Thorne R.G., Frey W.H. Delivery of neurotrophic factors to the central nervous system: pharmacokinetic considerations // Clin. Pharmacokinet. – 2001. – 40. – P. 907–946.

*Матеріал надійшов до редакції 10.04.2013*

Б.О. Манько, В.В. Манько

## Вплив аденозиндифосфату на дихання мітохондрій *in situ* ацинарних клітин підшлункової залози щурів

*Досліджено вплив аденозиндифосфату (АДФ) на дихання мітохондрій *in situ* ацинарних клітин підшлункової залози. Для цього використано модель оброблених дигітоніном панкреатичних ацинусів. Встановлено, що сукцинат або суміш пірувату, глутамату і малату інтенсифікували дихання пермеабілізованих клітин. АДФ у низькій концентрації (100 мкмоль/л) не впливав на швидкість споживання кисню. Тоді як за вищої його концентрації (750 мкмоль/л) спостерігалася короткочасна інтенсифікація дихання у номінально безкальцієвому середовищі. За зниження вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі до 100 нмоль/л АДФ не впливав на споживання кисню, а швидкість дихання, стимульованого сумішшю пірувату, глутамату і малату, зроста. Швидкість сукцинатстимульованого дихання не залежала від вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі. Наявність АТФ у середовищі знижувало стимулювальну дію АДФ, але збільшувало її тривалість. Однак ефекти АДФ не блокувались олігоміцином як за окиснення сукцинату, так і суміші пірувату, глутамату і малату. Отже, інтенсифікація дихання пермеабілізованих ацинарних панкреатитів при додаванні у середовище АДФ, яка проявляється лише за підвищеного вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі, не пов'язана з окисним фосфорилуванням. Виявлений ефект АДФ може бути новим «функціональним маркером» розвитку патологічних процесів у мітохондріях ацинарних панкреатитів.*

*Ключові слова:* ацинарні панкреатити, мітохондрії *in situ*, споживання кисню,  $\text{Ca}^{2+}$ , АДФ.

### ВСТУП

У фізіології важливо застосовувати ті методи, які дають можливість найкраще спостерігати за певним процесом і чинять на нього мінімальний вплив. Це стосується і біоенергетики. Останнім часом спостерігається відхід від класичних методів, які давали змогу досліджувати кінетику окисних процесів на субклітинних елементах: ізольованих мітохондріях, мікросомах, екстрактах водорозчинних ферментів чи їхніх системах, а також ізольованих мембранних ферментах, вбудованих у штучні мембрани. Застосування такого підходу дало знання про структуру, функції та можливості регуляції окисних систем клітини. Проте це аж ніяк не значить, що ми можемо перенести ці знання на реальну динаміку окисних процесів у живій клітині за різних її станів. Саме для цього розробляють методи, які дають змогу аналізувати стан

© Б.О. Манько, В.В. Манько

мітохондрій у клітинах. До таких належать, зокрема, ядерно-магнітний резонанс і флуоресцентні методи. І хоча останні дають можливість з високою точністю та наближеністю до умов *in vivo* в реальному часі аналізувати вміст ключових «діючих осіб» мітохондріального окиснення – відновленого нікотинамідаденіндинуклеотиду (НАДН), відновленого флавінаденіндинуклеотиду (ФАДН<sub>2</sub>), АТФ, мітохондріального мембранного потенціалу [16, 22–24], вони втрачають переваги методів-попередників. А саме, обмежується доступ до мітохондрій речовин, непроникних через плазматичну мембрану – іонів, субстратів окиснення, аденілових нуклеотидів, деяких специфічних активаторів чи інгібіторів; це не дає можливості повністю контролювати чи модифікувати склад внутрішньоклітинного середовища для виявлення та аналізу механізмів дії певних досліджуваних чинни-

ків. Щоб подолати ці недоліки, проникність плазматичної мембрани для досліджуваних речовин збільшують за допомогою хімічної пермеабілізації або застосовуючи методи patch-clamp і двофотонної лазерної мікроскопії [7, 8, 23].

Нашу увагу привернув метод дослідження дихання мітохондрій у пермеабілізованих клітинах, або за умов *in situ*, апробований на м'язових клітинах [14, 19], гепатоцитах [1] і клітинах лімфоми [11]. Цей підхід є одним із способів поєднати переваги дослідження дихання ізольованих мітохондрій та цілісних клітин. Він полягає у селективній пермеабілізації плазматичної мембрани неіонним детергентом дигітоніном із подальшою реєстрацію споживання кисню за різних метаболічних станів мітохондрій, які близькі до станів ізольованих мітохондрій, описаних Чансом та Вільямсом [5]. Як стверджують піонери цього методу [14, 19], такий підхід має кілька переваг: збережені взаємозв'язки мітохондрій з іншими органелами, мітохондрії не зазнають пошкоджень у процесі пермеабілізації плазматичної мембрани, для аналізу достатньо порівняно невеликої кількості тканини.

У попередньому дослідженні [15] ми підібрали умови пермеабілізації та спробували змодельовати стани мітохондрій *in situ* ацинарних панкреатитів, близькі до станів за Чансом. Однак ми не виявили стимулювальної дії АДФ на дихання пермеабілізованих ацинарних панкреатитів. Метою цієї роботи було детально дослідити вплив АДФ на дихання мітохондрій *in situ* ацинарних панкреатитів за різних умов інкубації.

## МЕТОДИКА

Досліди виконані на білих нелінійних щурах-самцях масою 250–300 г. Тварин утримували в стаціонарних умовах віварію за постійної температури на основному раціоні. Щурів наркотизували хлороформом, після чого декапітували, робили розтин черевної порожнини і швидко видаляли підшлункову залозу.

Усі маніпуляції з тваринами проводились згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, та Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Суспензію ізольованих панкреатичних ацинусів отримували з використанням колагенази (220 од./мл) за модифікованим методом Вільямса і співавт. [25], як описано раніше [15]. Клітини (мінімальна кількість 400) підраховували за допомогою камери Горяєва. Для оцінки цілісності плазматичної мембрани клітини фарбували трипановим синім (0,1 %). Кількість клітин з цілісними плазматичними мембранами становила не менше ніж 90 %. Після виділення ацинуси зберігали у базовому позаклітинному середовищі у відкритій конічній колбі, струшуючи із частотою 120 циклів за 1 хв, за кімнатної температури. У колбу подавали свіже повітря, як і під час інкубації з колагеназою.

Для дослідження дихання мітохондрій *in situ* за окиснення екзогенних субстратів ми здійснювали пермеабілізацію плазматичної мембрани з використанням дигітоніну. Ізольовані ацинуси центрифугували і замінювали позаклітинне середовище на одне з середовищ інкубації пермеабілізованих панкреатитів. Після внесення суспензії у полярографічну комірку додавали дигітонін (у розрахунку 50 мкг/10<sup>6</sup> клітин у 1 мл суспензії) [15]. Тривалість дії дигітоніну перед внесенням субстрату окиснення становила 5 хв.

Швидкість споживання кисню визначали полярографічним методом [5]. Значення дифузного струму реєстрували за допомогою полярографічної установки, зібраної на базі електрода Кларка, полярографа YSI 5300, потенціометра КСП-4, магнітної мішалки для розмішування суспензії та скляної термостатованої закритої комірки об'ємом 1,6 мл. Дихання мітохондрій панкреатичних ацинусів *in situ* реєстрували за температури інкубації 37°C. Для активації ФАД-залежного шляху використовували як субстрат окиснен-



ня сукцинат (5 ммоль/л), а для максимальної активації НАД-залежних шляхів – суміш пірувату, глутамату і малату (по 5 ммоль/л). Для стимуляції окисного фосфорилування додавали АДФ до концентрації 100 або 750 мкмоль/л. Кількість фосфорильованого АДФ розраховували, помноживши кількість поглинутого кисню у фазі стимуляції дихання АДФ на величину загальноприйнятих коефіцієнтів Р/О (1,6 – для сукцинату, 2,3 – для НАД-залежних субстратів [10]). Швидкість дихання розраховували, вважаючи, що в 1 мл розчинено 200 нмоль  $O_2$  [4].

Базове позаклітинне середовище містило (ммоль/л): NaCl – 140,0, KCl – 4,7,  $CaCl_2$  – 1,3,  $MgCl_2$  – 1,0, HEPES – 10,0, глюкоза – 10,0; бичачий сироватковий альбумін – 2,5 мг/мл, соєвий інгібітор трипсину – 0,1 мг/мл; рН 7,4. У деяких випадках склад розчину модифікували: додавали колагеназу («Sigma» або «Gibco», type IV, 220 од./мл) або підвищували вміст альбуміну до 40 мг/мл. Базове (ЕГТА-вмісне) середовище інкубації пермеабілізованих панкреатитів містило (ммоль/л): KCl – 127,0, NaCl – 20,0,  $KH_2PO_4$  – 2,0,  $MgCl_2$  – 1,0, EGTA – 1,0,  $CaCl_2$  – 0,28 ( $[Ca^{2+}] = 10^{-7}$  моль/л), HEPES – 10,0; соєвий інгібітор трипсину – 0,1%; рН 7,2 [8]. Концентрація вільного  $Ca^{2+}$  була розрахована за допомогою програми Ca/Mg/ATP/EGTA Calculator v1 (<http://maxchelator.stanford.edu>). Також це середовище модифікували: не додавали EGTA і  $CaCl_2$ , створюючи номінально безкальцієве середовище. Концентрація  $Ca^{2+}$  у ньому, визначена з допомогою  $Ca^{2+}$ -селективного електрода Corning Calcium 476041, становила  $6,54 \pm 2,86$  мкмоль/л ( $n = 6$ ). Крім того, у деяких дослідженнях додавали АТФ у концентрації 2 ммоль/л.

Кожну серію досліджень проводили на 3–5 окремих препаратах ацинусів, отриманих із різних тварин. Необхідні статистичні розрахунки здійснювали за допомогою комп'ютера з використанням пакету програм Microsoft Office Excel. Результати представлені як  $M \pm m$ . Вірогідність різниці середніх

арифметичних двох вибірок оцінювали за критерієм  $t$  Стюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

1. Дослідження впливу АДФ на дихання пермеабілізованих панкреатитів у різних середовищах

Проникнення субстратів мітохондріального окиснення через плазматичну мембрану клітини є обмеженим. Відомо, що плазматична мембрана гепатоцитів майже непроникна для сукцинату та глутамату [9]. Доведено проникність через інтактну плазмалему ацинарних клітин підшлункової залози лише для пірувату [26] і глутамату [12]. Однак у наших попередніх дослідженнях піруват, глутамат, малат, сукцинат чи субстрат АТФ-синтази АДФ не стимулювали дихання суспензії інтактних панкреатичних ацинусів [15]. Навіть якщо деяка кількість цих речовин і проникала у клітину, цього недостатньо для стимуляції дихання.

Власне, це й зумовило необхідність використання методу пермеабілізації плазматичної мембрани для дослідження дихання мітохондрій *in situ*. Для цього ми застосували дигітонін – неіонний детергент, який селективно зв'язується із холестерином, утворює з ним нерозчинні комплекси, що й призводить до виникнення пор у плазматичній мембрані [17]. Вміст холестерину в плазмалемі на кілька порядків вищий, ніж у інших мембранах клітини [6]. Це дає змогу селективно пермеабілізувати плазмалему, підбравши оптимальну концентрацію дигітоніну, що і було здійснено у попередніх дослідженнях [15].

Для того щоб перевірити проникність плазматичної мембрани для субстратів та інтактність мітохондрій пермеабілізованих клітин, експеримент проводили за такою схемою. У полярографічну комірку вносили суспензію інтактних ацинусів та протягом декількох хвилин реєстрували дихання. Після цього здійснювали пермеабілізацію плазматичної мембрани панкреатитів, дода-



ючи дигітонін. Через 5 хв вносили субстрат окиснення, а згодом – 750 мкмоль/л АДФ.

За інкубації у номінально безкальцієвому середовищі швидкість ендogenous дихання інтактних ацинарних панкреатитів, зібраних у ацинуси, становила  $0,26 \pm 0,04$  нмоль  $O_2$  / (с ·  $10^6$  клітин; рис. 1). Це дещо більше, ніж дихання повністю ізольованих ацинарних панкреатитів [13, 20]. Після додавання дигітоніну ми спостерігали поступове зниження швидкості дихання, яка стабілізувалася приблизно через 3–5 хв. Новий стан виникав, очевидно, внаслідок заміни іонного складу цитозолу та виходу ендogenous субстратів окиснення із клітини в процесі пермеабілізації і характеризувався нижчою на 35–45 % швидкістю споживання кисню порівняно з диханням інтактних ацинусів ( $P \leq 0,05$ ,  $n = 5$ ; рис. 1,а,б). Як і в попередніх дослідженнях на інших тканинах [1, 11], ФАД-залежний субстрат сукцинат суттєво інтенсифікував споживання кисню до  $0,34 \pm 0,04$  нмоль  $O_2$  / (с ·  $10^6$  клітин) ( $P \leq 0,01$ ,  $n = 5$ ; див. рис. 1,а). Наступне додавання АДФ інтенсифіку-

вало дихання ще на  $98 \pm 13$  % ( $P \leq 0,01$ ,  $n = 5$ ; див. рис. 1,а, фаза 1). Після завершення стимулювальної дії АДФ швидкість дихання зменшувалась і була така сама, як і перед його додаванням (див. рис. 1,а, фаза 2). За використання ЕГТА-вмісного середовища швидкість дихання інтактних чи пермеабілізованих панкреатитів у більшості випадків не відрізнялася від попередніх результатів (див. рис. 1,а,б). Однак, парадоксально, додавання до ЕГТА-вмісного середовища АДФ не стимулювало дихання (див. рис. 1,а).

Дещо інші результати отримано за окиснення суміші пірувату, глутамату і малату (НАД-залежні субстрати). Додавання до номінально безкальцієвого середовища цих субстратів стимулювало дихання до  $0,19 \pm 0,01$  нмоль  $O_2$  / (с ·  $10^6$  клітин) ( $P \leq 0,01$ ,  $n = 5$ ; див. рис. 1,б). Внесення АДФ на їхньому тлі призвело до стимуляції дихання ще на  $136 \pm 21$  % ( $P \leq 0,01$ ,  $n = 5$ ; див. рис. 1,б, фаза 1). Як і в попередній серії, через деякий час швидкість дихання знижувалася до того самого рівня, як і перед додаванням АДФ

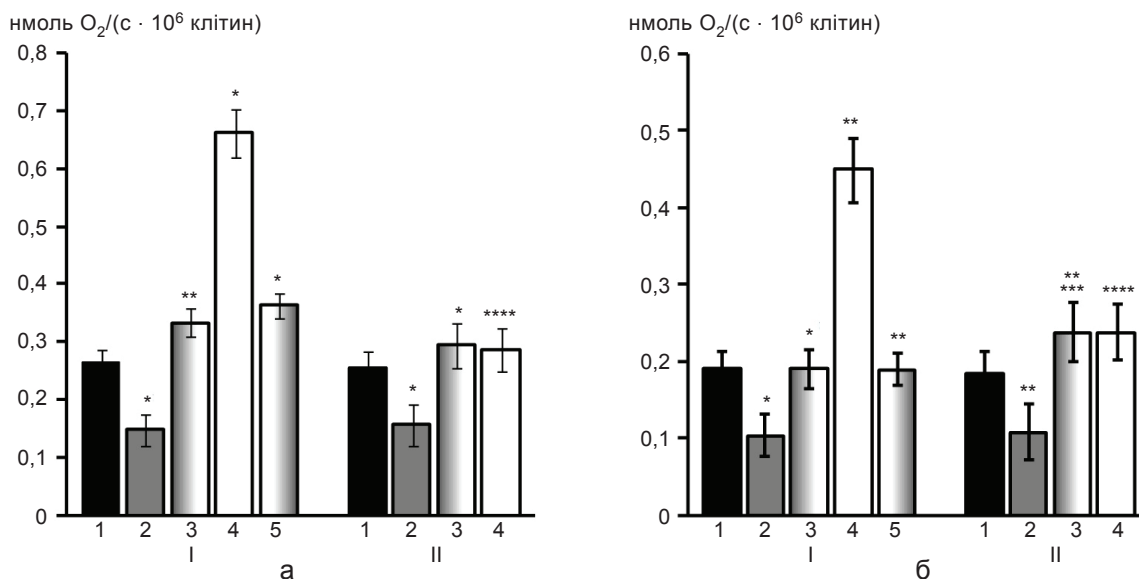


Рис. 1. Вплив середовища інкубації на дихання пермеабілізованих ацинарних панкреатитів за окиснення сукцинату (а) або суміші пірувату, глутамату і малату (б): I – номінально безкальцієве середовище, II – ЕГТА-вмісне середовище; 1 – дихання інтактних клітин; 2 – додано дигітонін; 3 – додано субстрат окиснення; 4 – додано АДФ, фаза 1; 5 – АДФ, фаза 2; \* статистично вірогідна різниця щодо попереднього показника з  $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$ ; \*\*\* статистично вірогідна різниця щодо показника у номінально безкальцієвому середовищі з  $P \leq 0,05$ , \*\*\*\* з  $P \leq 0,001$

(див. рис. 1,б, фаза 2). У середовищі з ЕГТА субстрати окиснення сильніше стимулювали споживання кисню клітинами – до рівня, який на  $27,1 \pm 8,7\%$  вищий, ніж за їх інкубації у номінально безкальцієвому середовищі. Як і за окиснення сукцинату, АДФ не стимулював дихання ацинарних клітин. Правда, у трьох окремих експериментах (результати не представлені) ми не спостерігали інтенсифікації дихання за внесення АДФ незалежно від складу середовища.

Дослідження природи АДФ-стимульованого дихання пермеабілізованих ацинарних клітин підшлункової залози

Під час подальшого аналізу показників окисного дихання і окисного фосфорилування нашу увагу привернула надто короткочасна тривалість перебігу фази інтенсифікації споживання кисню після додавання АДФ за використання номінально безкальцієвого середовища (табл. 1). Відомо, що за умов *in situ* фаза АДФ-стимульованого дихання є здебільшого набагато тривалішою, ніж при дослідженні ізольованих мітохондрій (до декількох хвилин), і не припиняється навіть у часових рамках досліду [1, 11, 14, 19]. Це можливо через високу активність внутрішньоклітинних АТФаз, які постійно підтримують достатню для окисного фосфорилування концентрацію АДФ.

Відповідно до незначної тривалості «стану фосфорилування» значення коефіцієнтів Р/О, розраховані як співвідношення кількості доданого АДФ до кількості поглинутого атомарного кисню у фазі стимуляції (див. рис. 1,а,б, фаза 1), виявилися парадоксально високими за всіх умов досліду. Так, відомо, що

при інтактності мітохондрій ці коефіцієнти становлять, в середньому, 2,3 за окиснення субстратів НАД-залежних дегідрогеназ і 1,6 – за окиснення сукцинату [10]; для ізольованих мітохондрій не виявлено вищих коефіцієнтів, ніж 4 [10]. Одним з пояснень феномену надвисоких стехіометричних відношень Р/О може бути те, що за умов підвищених концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$  у внутрішньоклітинному середовищі лише незначна частина доданого АДФ зазнає фосфорилування. Якщо припустити, що за цих умов відношення Р/О залишаються нормальними, то згідно з розрахунками фосфорилується лише 1–3% екзогенного АДФ (див. табл. 1). Отже, ймовірно, мітохондрії швидко втрачають здатність фосфорилувати АДФ у номінально безкальцієвому середовищі. Варто зазначити також, що визначення співвідношення Р/О для окисного фосфорилування мітохондрій *in situ* може бути не зовсім коректним, оскільки вміст ендогенних аденілових нуклеотидів невідомий.

З іншого боку, можливим є і те, що стимуляція дихання за додавання АДФ взагалі не пов'язана з окисним фосфорилуванням. Для перевірки цієї гіпотези ми дослідили зміни швидкості дихання при послідовному внесенні різних доз АДФ. Вміст АДФ у інтактних ацинарних панкреацитах становить  $0,36\text{--}1,07 \text{ нмоль} / 10^6 \text{ клітин}$  [13], а у дослідженнях мітохондріального дихання застосовують АДФ у концентраціях  $0,1\text{--}1 \text{ ммоль/л}$  [5, 14, 19]. Якщо під час АДФ-стимульованого дихання відбувається фосфорилування, тривалість ефекту мала б залежати від доданої його кількості. Зазвичай активація окисного фосфорилування ізольованих мітохондрій

**Таблиця 1. Показники окисного фосфорилування мітохондрій ацинарних панкреацитів *in situ* за використання номінально безкальцієвого середовища**

Умови досліду	Тривалість «стану фосфорилування», с	Відношення Р/О	Кількість фосфорильованого АДФ, нмоль	Кількість фосфорильованого АДФ, % від доданого
Сукцинат	$18,8 \pm 3,0$	$127,8 \pm 34,2$	$19,7 \pm 6,0$	$1,6 \pm 0,5$
Піруват, глутамат, малат	$17,5 \pm 2,3$	$140,8 \pm 17,7$	$20,7 \pm 2,9$	$1,7 \pm 0,2$

проходить за досить низьких концентрацій АДФ (на рівні  $10^{-4}$  моль/л). Але у наших дослідженнях внаслідок додавання у полірографічну комірку 0,16 нмоль АДФ (кінцева концентрація 100 мкмоль/л) дихання не інтенсифікувалося ( $n = 3$ ; рис. 2,а,б). Наступне внесення 1,2 нмоль/л АДФ (збільшення концентрації на 750 мкмоль/л) спричиняло тимчасову інтенсифікацію дихання. Якщо ж після завершення фази стимуляції повторно вносили ще 1,2 нмоль/л АДФ (збільшення концентрації ще на 750 мкмоль/л), його ефект на дихання був значно меншим, ніж попередній. Тобто меншими були швидкість стимульованого дихання (див. рис. 2,а,б), тривалість АДФ-стимульованого стану, і, відповідно, кількість кисню, поглинутого у цьому стані ( $P \leq 0,05$ ,  $n = 3$ ; табл. 2). А теоретично за умов повного фосфорилування перших 1,2 нмоль/л АДФ ефект наступних 1,2 нмоль/л мав би бути таким самим.

Для додаткової перевірки, чи АДФ-індукована стимуляція споживання кисню пов'язана з окисним фосфорилуванням, ми застосували інгібітор АТФ-синтази олігоміцин. Виявлено, що дихання інтактних клітин у номінально безкальцієвому середовищі

приблизно наполовину знижується після додавання цього інгібітора ( $P \leq 0,01$ ,  $n = 3$ ; див. рис. 2,а,б). Ендогенне дихання пермеабілізованих клітин не змінювалося внаслідок додавання олігоміцину. Швидкості субстрат-чи субстрат+АДФ-стимульованого дихання за наявності олігоміцину були нижчими на 10–25 % ( $n = 3$ ; див. рис. 2,а,б), однак ці зміни не виявилися статистично вірогідними. І це є парадоксальним, адже олігоміцин не усував стимуляції дихання при додаванні високих доз АДФ. Тому отримані результати підтверджують те, що АДФ-індукована стимуляція дихання не пов'язана із його фосфорилуванням. Причиною цього може бути порушення мітохондріальних функцій внаслідок того, що у номінально безкальцієвому середовищі концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  є значно вищою, ніж фізіологічна.

Так, у недавніх дослідженнях, проведених на ізольованих мітохондріях панкреатитів [18], показано, що вже за мікромольних концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$  деполяризується внутрішня мембрана мітохондрій підшлункової залози. Цікаво, що класичний блокатор мітохондріальної пори неспецифічної проникності циклоспорин А лише наполовину блокував деполяризацію мітохондріальної мембрани і

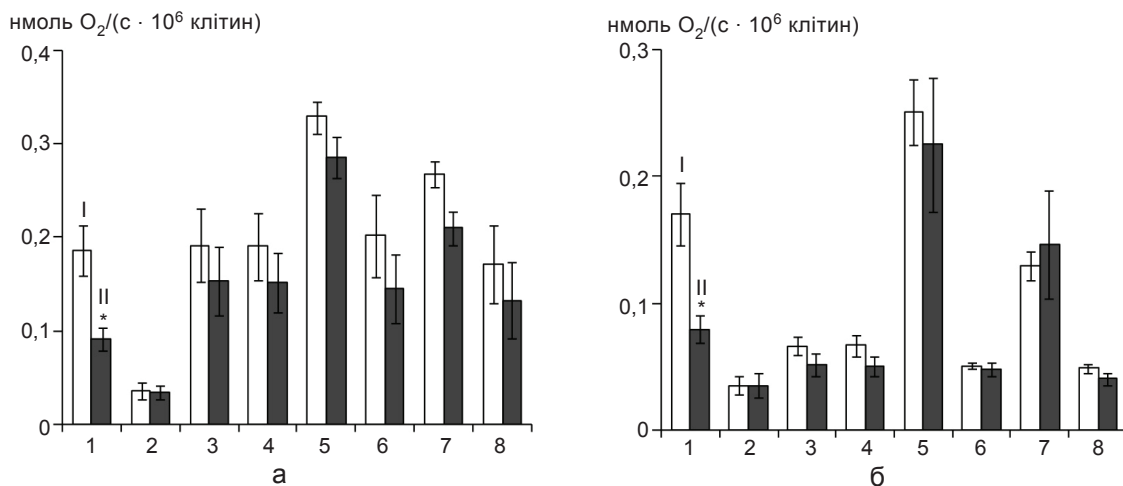


Рис. 2. Вплив олігоміцину та різних доз АДФ на дихання пермеабілізованих ацинарних панкреатитів у номінально безкальцієвому середовищі за окиснення сукцинату (а) або суміші пірувату, глутамату і малату (б): I – контроль; II – олігоміцин; 1 – дихання інтактних клітин; 2 – додано дигітонін; 3 – додано субстрат окислення; 4 – додано 0,16 нмоль АДФ; 5 – додано 1,2 нмоль АДФ, фаза 1; 6 – АДФ, фаза 2; 7 – додано ще 1,2 нмоль АДФ, фаза 1; 8 – АДФ, фаза 2; \* статистично вірогідна різниця щодо контролю  $z P \leq 0,05$

**Таблиця 2. Параметри АДФ-стимульованого дихання пермеабілізованих ацинарних панкреатитів за дії олігоміцину**

Умови досліджу		Тривалість активного дихання після додавання АДФ, с		Кількість поглинутого кисню у стані активного дихання після додавання АДФ, нмоль O <sub>2</sub>	
		контроль	олігоміцин	Контроль	олігоміцин
Сукцинат	АДФ 1	50,7±24,6	39,3±17,8	6,24±0,92	4,42±0,86
	АДФ 2	21,3±9,4	12,6±4,3	1,21±0,34*	0,82±0,48*
Піруват, глутамат, малат	АДФ 1	21,3±4,7	22,0±3,8	4,73±1,17	4,71±1,76
	АДФ 2	9,97±2,7	15,0±5,0	0,93±0,31*	1,98±1,02*

Примітка: АДФ 1 – перше внесення 1,2 нмоль АДФ; АДФ 2 – друге внесення 1,2 нмоль АДФ; \* статистично вірогідна різниця щодо показника при першому внесенні АДФ з  $P \leq 0,05$ .

не пригнічував вихід цитохрому с з них. Натомість, блокатор мітохондріального транспортера аденинових нуклеотидів бонгкрекова кислота, а також АДФ у високій (!) концентрації повністю інгібували вихід цитохрому і запобігали деполяризації [18]. Вважають, що цей транспортер є або компонентом активної циклоспоринчутливої пори неспецифічної проникності, або суттєво впливає на її стан [2]. Отже, АДФ, як і бонгкрекова кислота, зв'язуючись із транспортером, якимось чином впливає на функціонування циклоспоринчутливої пори неспецифічної проникності за перевантаження мітохондрій  $Ca^{2+}$ .

Ми припустили, що інтенсифікація дихання мітохондрій *in situ* ацинарних панкреатитів внаслідок додавання АДФ теж пов'язана зі зміною стану мітохондріального транспортера аденинових нуклеотидів. На наступному етапі було досліджено вплив АТФ (речовини, що також впливає на стан цього транспортера) на АДФ-індуковані зміни дихання за окиснення субстратів НАД-залежних дегідрогеназ. Для цього здійснювали преінкубацію пермеабілізованих клітин з АТФ (2 ммоль/л) у номінально безкальцієвому середовищі протягом 15 хв. АТФ статистично вірогідно підвищував швидкість субстратстимульованого дихання, але до внесення у комірку АДФ. Швидкість АДФ-стимульованого дихання, навпаки, знижувалася ( $P \leq 0,05$  або  $\leq$

0,01,  $n = 5$ ; рис. 3). Ймовірно, що швидкість субстратстимульованого дихання зростала внаслідок кращого збереження клітинних функцій за наявності АТФ, наприклад, уможливлення функціонування  $Ca^{2+}$ -помп ендоплазматичного ретикулума, що усували б надлишковий  $Ca^{2+}$  із середовища [21]. Проте не виключаємо можливості збільшення пулу ендогенного АДФ за активації внутрішньоклітинних АТФаз. Відсутність впливу АТФ на дихання після додавання АДФ вказує на зміну функціонального стану мітохондрій, природа якої залишається невідомою.

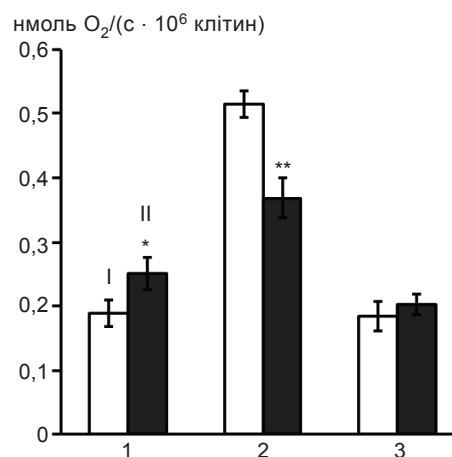


Рис. 3. Вплив АТФ та АДФ на дихання пермеабілізованих ацинарних панкреатитів: I – контроль; II – АТФ; 1 – субстратстимульоване дихання; 2 – АДФ (фаза 1, стимуляція); 3 – АДФ (фаза 2, після стимуляції); \* статистично вірогідна різниця щодо контролю,  $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$

АТФ, поряд із зниженням швидкості АДФ-стимульованого дихання, статистично вірогідно підвищив тривалість цієї фази від  $21,96 \pm 1,64$  до  $63,18 \pm 16,50$  с ( $P \leq 0,05$ ,  $n = 5$ ). Фактично, наявність АТФ не вплинула на кількість спожитого кисню у фазу АДФ-стимульованого дихання, а лише «розтягнула» ефект АДФ у часі. Оскільки АДФ-індукована інтенсифікація дихання не пов'язана із фосфорилуванням, інгібіторний вплив АТФ реалізується, очевидно, через модуляцію активності транспортера аденінових нуклеотидів.

Варто зазначити, що у пермеабілізованих ацинарних панкреатитах наявна, ймовірно, достатня кількість ендогенного АДФ для підтримання фосфорилування. Адже відомо, що після пермеабілізації у цитозолі та мітохондріях гепатоцитів залишаються високі його запаси [3]. Це підтверджується тим, що у середовищі із фізіологічною концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$  (100 нмоль/л) олігоміцин суттєво знижував швидкість субстратстимульованого дихання [15]. Тобто вже після додавання екзогенних субстратів до пермеабілізованих ацинарних панкреатитів виникає стан мітохондрій, подібний до стаціонарного стану 3 за Чансом [5].

Натомість у середовищі з підвищеною концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$  (номінально безкальцієвому) спостерігався аномальний ефект АДФ зниження швидкості дихання за окиснення субстратів НАД-залежних дегідрогеназ. Виходячи з наведених даних, ми припускаємо, що за умов підвищеної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  та, ймовірно, деполяризації мітохондрій [18], екзогенний АДФ у високій концентрації здатний стимулювати дихання завдяки зв'язуванню з транспортером аденінових нуклеотидів та/або зміною стану циклоспоринчутливої пори неспецифічної проникності [2]. Інгібування пори при додаванні АДФ повинне впливати на такі характеристики мітохондрій, як мембранний потенціал, внутрішньомітохондріальний іонний склад чи набрякання. Очевидно, це відображається у зафіксованій нами короткочасній інтенсифікації дихання.

Проте для підтвердження цієї гіпотези слід провести дослідження впливу АДФ на інші мітохондріальні показники, зокрема, потенціал мітохондрій з використанням потенціалчутливих мітохондріальних барвників.

За використання номінально безкальцієвого середовища мітохондрії зберігають певну функціональну активність, а не гинуть повністю. Про це свідчить стимуляція дихання пермеабілізованих клітин субстратами окиснення. Відомо також, що у номінально безкальцієвому середовищі мітохондрії пермеабілізованих ацинарних панкреатитів здатні впродовж тривалого періоду інтенсивно акумулювати  $\text{Ca}^{2+}$  [20]. Тому ми вважаємо, що за умов використання номінально безкальцієвого середовища мітохондрії *in situ* характеризуються лише частковим порушенням функцій, що відповідає початковим етапам розвитку патологічних процесів, зокрема, апоптозу [18]. У зв'язку із цим виявлений ефект короткочасної інтенсифікації дихання за дії високої концентрації АДФ може бути новим «функціональним маркером» патологічних процесів у мітохондріях підшлункової залози, а також ключем для розуміння механізмів їх розвитку.

Автори висловлюють щирю подяку доцентів кафедри анатомії і фізіології Львівського державного університету фізичної культури, кандидатів біологічних наук Гриньків М. Я. за надану методичну допомогу.

**Б.А. Манько, В.В. Манько**

#### **ВЛИЯНИЕ АДЕНОЗИНДИФОСФАТА НА ДЫХАНИЯ МИТОХОНДРИЙ IN SITU АЦИНАРНЫХ КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫС**

Исследовано влияние адениндиндифосфата (АДФ) на дыхания митохондрий *in situ* ацинарных клеток поджелудочной железы. Для этого использована модель обработанных дигитонином панкреатических ацинусов. Установлено, что вследствие добавления сукцината или смеси пирувата, глутамата и малата дыхание пермеабелизованных клеток интенсифицировалось. АДФ в низкой концентрации (100 мкмоль/л) не влиял на скорость поглощения кислорода. Тогда как при более высокой его концентрации (750 мкмоль/л) наблюдалась кратковременная интенсифика-



ция дыхания в номинально безкальциевой среде. При снижении содержания  $\text{Ca}^{2+}$  в среде до 100 нмоль/л АДФ не влиял на поглощения кислорода, а скорость дыхания, стимулированного смесью пирувата, глутамата и малата, выросла. Скорость сукцинатстимулированного дыхания не зависела от содержания  $\text{Ca}^{2+}$  в среде. Наличие АТФ в среде снижало стимулирующее действие АДФ, но увеличивало его продолжительность. Однако эффекты АДФ не блокировались олигомицином как при окислении сукцината, так и смеси пирувата, глутамата и малата. Таким образом, интенсификация дыхания пермеабилizованных ацинарных панкреатитов при добавлении в среду АДФ, проявляющая только при повышенной содержания  $\text{Ca}^{2+}$  в среде, не связана с окислительным фосфорилированием. Обнаруженный эффект АДФ может быть новым «функциональным маркером» развития патологических процессов в митохондриях ацинарных панкреатитов.

Ключевые слова: ацинарные панкреатиты, митохондрии *in situ*, поглощение кислорода,  $\text{Ca}^{2+}$ , АДФ.

**B.O. Manko, V.V.Manko**

# INFLUENCE OF ADENOSINE DIPHOSPHATE ON RESPIRATION OF RAT PANCREATIC ACINAR CELLS MITOCHONDRIA IN SITU

The influence of adenosine diphosphate (ADP) on respiration of pancreatic acinar cell mitochondria *in situ* was studied. The model of digitonin-treated pancreatic acini was used. It was found that succinate or a mixture of pyruvate, glutamate and malate intensified respiration of permeabilized cells. Low ADP concentration (100  $\mu\text{M}$ ) did not influence the rate of oxygen uptake, whereas at higher concentration (750  $\mu\text{M}$ ) brief intensification of respiration was observed when using nominally  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium. When the medium with 100 nM  $\text{Ca}^{2+}$  was used, ADP had no effect on oxygen uptake, while the rate of respiration stimulated by a mixture of pyruvate, glutamate and malate increased. Rate of succinate-stimulated respiration did not depend on  $\text{Ca}^{2+}$  content in medium. The presence of ATP in the medium reduced the stimulatory effect of ADP, but increased its duration. Intensification of respiration by ADP, occurred only at elevated  $\text{Ca}^{2+}$  content, was not associated with oxidative phosphorylation because oligomycin did not inhibit it. The effect of ADP might be a novel “functional marker” of development of pathological processes in the mitochondria of acinar pancreocytes.

Key words: acinar pancreocytes, mitochondria *in situ*, oxygen uptake,  $\text{Ca}^{2+}$ , ADP.

*Ivan Franko National University of Lviv*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Мерлавський В.М., Манько Б.О., Іккерт О.В., Манько В.В. Енергетичні процеси ізольованих гепатоцитів за різної тривалості дії інсуліну // *Studia Biologica*. – 2010. – 4, № 3. – С. 15–22.
2. Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition // *Physiol. Rev.* – 1999. – 79, № 4. – P. 1127–1155.
3. Brocks D.G., Siess E.A., Wieland O.H. Validity of the digitonin method for metabolite compartmentation in isolated hepatocytes // *Biochem. J.* – 1980. – 188. – P. 207–212.
4. Carpenter J.H. New measurements of oxygen solubility in pure and natural water // *Limnol. Oceanogr.* – 1966. – 11. – P. 264–277.
5. Chance B., Williams G.R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. The steady state // *J. Biol. Chem.* – 1955. – 217. – P. 409–427.
6. Colbeau A., Nachbaur J., Vignais P.M. Enzymic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1971. – 249, № 2. – P. 462–492.
7. Gerasimenko J.V., Sherwood M., Tepikin A.V., Petersen O.H., Gerasimenko O.V. NAADP, cADPR and IP<sub>3</sub> all release  $\text{Ca}^{2+}$  from the endoplasmic reticulum and an acidic store in the secretory granule area // *J. Cell Sci.* – 2006. – 119. – P. 226–238.
8. Gerasimenko Yu., Lur G., Sherwood M.W., Ebisui E., Tepikin A.V., Mikoshiba K., Gerasimenko O.V., Petersen O.H. Pancreatic protease activation by alcohol metabolite depends on  $\text{Ca}^{2+}$  release via acid store IP<sub>3</sub> receptors // *PNAS*. – 2009. – 106, № 26. – P. 10758–10763.
9. Hems R., Stubbs M., Krebs H.A. Restricted permeability of rat liver for glutamate and succinate // *Biochem. J.* – 1968. – 107. – P. 807–815.
10. Hinkle P.C. P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2005. – 1706. – P. 1–11.
11. Horbay R.O., Manko B.O., Manko V.V., Lootsik M.D., Stoika R.S. Respiration characteristics of mitochondria in parental and giant transformed cells of the murine Nemeth-Kellner lymphoma // *Cell Biol. Int.* – 2012. – 36, № 1. – P. 71–77.
12. Howell J.A., Matthews A.D., Swanson K.C., Harmon D.L., Matthews J.C. Molecular identification of high-affinity glutamate transporters in sheep and cattle forestomach, intestine, liver, kidney, and pancreas // *J. Anim. Sci.* – 2001. – 79. – P. 1329–1336.
13. Kosowski H., Schild L., Kunz D., Halangk W. Energy metabolism in rat pancreatic acinar cells during anoxia and reoxygenation // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1998. – 1367. – P. 118–126.
14. Kuznetsov A.V., Veksler V., Gellerich F.N., Saks V., Margreiter R., Kunz W.S. Analysis of mitochondrial function *in situ* in permeabilized muscle fibers, tissues and cells // *Nat. Protoc.* – 2008. – 3, № 6. – P. 965–976.
15. Manko B.O., Klevets M.Y., Manko V.V. An implication of novel methodology to study pancreatic acinar mitochondria under *in situ* conditions // *Cell Biochem. Funct.* – 2013. – 31, № 2. – P. 115–121.
16. Matsumoto T., Kanno T., Seo Y., Murakami M., Watari H. Phosphorus nuclear magnetic resonance in isolated

- perfused rat pancreas // *Am J Physiol.* – 1988. – 254. – P. G575–G579.
17. Nishikawa M., Nojima Sh., Akiyama T. Sankawa U., Inoue K. Interaction of digitonin and its analogs with membrane cholesterol // *J. Biochem.* – 1984. – 96. – P. 1231–1239.
18. Odinkova I.V., Sung K.-F., Mareninova O.A., Hermann K., Evtodienko Y., Andreyev A., Gukovsky I., Gukovskaya A.S. Mechanisms regulating cytochrome c release in pancreatic mitochondria // *Gut.* – 2009. – 58. – P. 431–442.
19. Saks V.A., Veksler V.I., Kuznetsov A.V., Kay L., Sikk P., Tiivel T., Tranqui L., Olivares J., Winkler K., Wiedemann F., Kunz W.S. Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function *in vivo* // *Mol. Cell. Biochem.* – 1998. – 184. – P. 81–100.
20. Schulz H.U., Pross M., Meyer F., Matthias R., Halangk W. Acinar cell respiration in experimental acute pancreatitis // *Shock.* – 1995. – 3, № 3. – P. 184–188.
21. Streb H., Schulz I. Regulation of cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in acinar cells of rat pancreas // *Amer. J. Physiol.* – 1983. – 245. – P. G347–G357.
22. Voronina S., Sukhomlin T., Johnson P.R., Erdemli G., Petersen O.H., Tepikin A. Correlation of NADH and  $\text{Ca}^{2+}$  signals in mouse pancreatic acinar cells // *J. Physiol.* – 2002. – 539, № 1. – P. 41–52.
23. Voronina S.G., Barrow S.L., Gerasimenko O.V., Petersen O.H., Tepikin A.V. Effects of secretagogues and bile acids on mitochondrial membrane potential of pancreatic acinar cells: comparison of different modes of evaluating  $\Delta\Psi_m$  // *J. Biol. Chem.* – 2004. – 279, № 26. – P. 27327–27338.
24. Voronina S.G., Barrow S.L., Simpson A.W.M., Gerasimenko O.V., da Silva Xavier G., Rutter G.A., Petersen O.H., Tepikin A.V. Dynamic changes in cytosolic and mitochondrial ATP levels in pancreatic acinar cells // *Gastroenterology.* – 2010. – 138. – P. 1976–1987.
25. Williams J.A., Korc M., Dormer R.L. Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini // *Amer. J. Physiol.* – 1978. – 235, № 5. – P. 517–524.
26. Zhao C., Wilson M.C., Schuit F. Halestrap A.P., Rutter G.A. Expression and distribution of lactate/monocarboxylate transporter isoforms in pancreatic islets and the exocrine pancreas // *Diabetes.* – 2001. – 50. – P. 361–366.

Львів. нац. ун-т ім.і Івана Франка  
E-mail: [mankobo@gmail.com](mailto:mankobo@gmail.com)

Матеріал надійшов до  
редакції 08.04.2013

О.А. Ходаківський

## Характеристика протиішемічних та мнемотропних властивостей адемолу при модельному гострому порушенні мозкового кровообігу

*У досліджах на щурах із модельним гострим порушенням мозкового кровообігу (білатеральна каротидна оклюзія) встановлено, що введення похідного адамантану 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанол (умовна назва адемола) у дозі 2 мг/кг внутрішньоочеревинно в лікувальному режимі (через 1 год після відтворення інсульту та далі через кожні 24 год упродовж 21 доби) ефективніше за цитиколін зменшує летальність та неврологічний дефіцит у гострому та відновлювальному періодах інсульту, а також покращує мнестичні функції. Отримані результати експериментально обґрунтовують доцільність створення на основі адемола вітчизняного церебропротекторного засобу. Ключові слова: адемола, цитиколін, гостре порушення мозкового кровообігу, церебропротекція.*

### ВСТУП

Однією з актуальних проблем медицини є цереброваскулярні захворювання, які посідають друге місце в структурі загальної смертності населення України, причому 70–85 % випадків припадає на гострі порушення мозкового кровообігу (ГПМК) за ішемічним типом [2]. Нові підходи до лікування ішемічного інсульту включають рекомендації щодо проведення тромболізу на ранньому етапі, застосування антикоагулянтів (гепарин, фраксипарин, еноксипарин тощо), антиагрегантів (аспірин, плавікс, трентал тощо) та засобів, які покращують мозковий кровообіг (вінпоцетин, серміон, цинаризин, антагоністи кальцію тощо) [5]. Однак їх повноцінне застосування в інтенсивній терапії не завжди є можливим внаслідок недостатньої ефективності, протипоказань та небажаних побічних ефектів. Все це зумовлює необхідність інтенсивної церебропротективної терапії вже на ранніх етапах розвитку церебральної ішемії [3, 12, 15]. Переважна більшість нейропротекторних засобів, на жаль, закордонного виробництва, що спричиняє суттєві збитки бюджету країни

[2]. Тому актуальним є пошук хімічних сполук, перспективних для створення ефективних і безпечних вітчизняних церебропротекторів [9]. Однією із таких перспективних сполук, на нашу думку, може стати похідне адамантану 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанол, умовна назва адемола. Його синтезовано Інституті органічної хімії НАН України під керівництвом акад. М.О. Лозинського. Раніше нами проведено фармакологічний скринінг 70 сполук цього хімічного ряду та виявлено, що саме адемола є лідером за антигіпоксичною, протиішемічною та церебропротекторною діями [8]. Як свідчать літературні дані, інтегративними показниками, що дають змогу оцінити якість захисного впливу потенційного нейропротектора на ішемізований головний мозок, є зменшення летальності та швидка ліквідація неврологічного дефіциту [4, 12]. Саме тому було доцільним оцінити вплив терапії адемолом змодельованого ГПМК.

Мета нашої роботи – дослідити церебропротекторні властивості адемола за динамікою неврологічних змін і мнестичних функцій у різні періоди експериментальної церебральної ішемії.

## МЕТОДИКА

Нейропротективну дію адемолу вивчали на моделі ГПМК за ішемічним типом у передньомозковому басейні створенням білатеральної каротидної оклюзії (БКО) за рахунок перев'язки каротидних артерій. Лігатури на загальні сонні артерії накладали під пропофоловим наркозом (60 мг/кг; внутрішньоочеревинно), використовуючи хірургічний доступ на передній поверхні шиї розрізом через її білу лінію. Обрана модель дає змогу відтворити клінічну картину ішемічного інсульту і є адекватною для вивчення дії потенційних нейропротекторних речовин [12, 16]. Експериментальну терапію гострої церебральної ішемії адемолом у максимально ефективній дозі 2 мг/кг (внутрішньоочеревинно) розпочинали через 1 год після БКО, а далі один раз на добу упродовж 21 доби.

Раніше нами було встановлено, що механізм реалізації нейропротекторних властивостей адемолу пов'язаний із блокадою NMDA-глутаматних рецепторів [11], проте як препарат порівняння (референс-препарат) ми не мали можливості взяти церебропротектор з аналогічним механізмом дії. Це пов'язано з тим, що незважаючи на високу ефективність деяких з них (наприклад, мемантину) в умовах експериментальної церебральної ішемії, клінічні випробовування їх дієвості та безпечності в умовах даної патології ще тривають [6, 18]. Ми врахували останні рекомендації щодо ведення хворих з ішемічним інсультом та транзиторними ішемічними атаками, розробленими комітетом Європейської інсультної організації (ESO, 2008) [7]. Вони, ґрунтуючись на всебічному аналізі всіх отриманих результатів стосовно ефективності того чи іншого засобу, розглядають можливість включення цитиколіну в стратегію нейропротекторної терапії. Свій вибір препарату порівняння ми зупинили саме на ньому. Він за рахунок цитопротекторних властивостей може позитивно впливати на регрес неврологічного дефіциту та покращу-

вати когнітивно-мнестичні функції у хворих із гострою церебральною ішемією [13, 14, 17, 22].

У наших дослідженнях цитиколін в умовах експериментального ГПМК вводили внутрішньоочеревинно в дозі 250 мг/кг за такою самою схемою, як і адемолом. Неврологічний дефіцит у тварин із ГПМК відповідно у гострому (4-та доба) та відновлювальному (21-ша доба) періодах вивчали за шкалою stroke-index McGrow [19]. Тяжкість стану визначали за сумою відповідних балів: до 3 балів – легкий ступінь, від 3 до 7 балів – середній ступінь, вище за 7 балів – тяжкий ступінь. Відмічали парези, паралічі кінцівок, тремор, манежні рухи, птоз, положення на боці, здатність щурів утримуватися на стрижні діаметром 15 см, що обертався зі швидкістю 3 об/хв. Тварин тестували щоденно, виставляючи суму балів:

однобічний напівптоз – 0,5 бала;

однобічний птоз – 1 бал;

тремор – 0,5 бала;

манежні рухи – 0,5 бала;

парези кінцівок (за кожну кінцівку) – 1 бал;

параліч кінцівок (за кожну кінцівку) – 2 бали;

бокове положення – 3 бали;

нездатність утриматись на обертовому стрижні протягом 4 хв – 3 бали.

Оцінку здатності тварин до навчання та запам'ятовування аверсивного стимулу досліджували в тесті умовної реакції пасивного уникання (УРПУ) [1]. Навчання щурів проводили в двокамерній установці, що складається з двох відсіків – світлого та темного. Тварину вміщували до світлого відсіку, фіксували латентний час входу в темний відсік, де щур отримував подразнення електричним струмом та вибігав у світлий відсік. Збереження УРПУ перевіряли через добу за зміною латентного часу входу щура до темного відсіку. Відмічали і кількість тварин, які повністю не зайшли в темну камеру. Критеріями церебропротекторної ефективності досліджуваних сполук були також термін загибелі тварин (у добах) та їх

летальність (у відсотках). Статистичну значущість відмінностей оцінювали за кутовим перетворенням Фішера (летальність) та за критерієм *t* Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведене дослідження показало, що БКО у щурів викликала тяжкі неврологічні зміни: паралічі, парези, птоз із максимальним проявом на 4-ту добу (табл. 1). Так, у цей термін спостереження у групі тварин, яким вводили лише фізіологічний розчин, середній бал становив 12,33, що відповідає тяжкому ступеню неврологічної симптоматики, а летальність була 66,6 %. На 21-шу добу не спостерігалось повного відновлення втрачених функцій ЦНС. На користь такого твердження, по-перше, вказував наявний неврологічний дефіцит (7,8 бала). По-друге, дослідження процесів пам'яті та навчання у цей період ГПМК свідчать про пригнічення мнестичних функцій за критерієм зменшення латентного періоду входу до темної камери, де тварини напередодні зазнавали електробольового подразнення, порівняно з показником інтактних щурів.

Експериментальне лікування щурів із ГПМК адемолом, як і цитиколіном сприя-

ло зменшенню смертності щурів протягом перших 4 діб (див. табл.1). Так, летальність на тлі введення похідного адамантану та референс-препарату зменшилася відносно значень щурів, яким вводили лише 0,9%-й розчин NaCl, становив 33,3 та 50 % відповідно, причому на тлі адемолу це зниження було вірогідним. Аналізуючи динаміку регресу неврологічного дефіциту, можна відзначити, що й за цією ознакою адемолом у ранній період ГПМК переважав дію цитиколіну: на 4-ту добу спостереження середній бал становив 7,5 щодо 9,2 ( $P < 0,05$ ). У відновлювальному періоді ГПМК обидва досліджувані препарати продемонстрували однакову спроможність знижувати неврологічну симптоматику – середній бал становив 4,60 та 4,78 відповідно (див. табл. 1). Щодо відновлення мнестичних функцій при ГПМК, цитиколін дещо покращував пам'ять, але поступався адемолу, який максимально наближав показники тесту УРІПУ до результатів інтактних тварин (табл. 2).

Таким чином, у щурів із гострою церебральною ішемією спостерігалася значна летальність упродовж перших 4 діб, яка супроводжувалася розвитком тяжкого неврологічного дефіциту та погіршенням процесів навчання і пам'яті у відновлювальному пері-

**Таблиця 1. Вплив внутрішньоочеревинного введення адемолу (2 мг/кг) та цитиколіну (250 мг/кг) на неврологічний дефіцит і летальність щурів із гострим порушенням мозкового кровообігу**

Група тварин	Неврологічний дефіцит за шкалою McGrow		Летальність на 4-ту добу, ум.од.
	на 4-ту добу	на 21-шу добу	
Інтактні тварини, n=10	0,00±0,00	0,00±0,00	0 (0,0 %)
Церебральна ішемія та введення			
0,9%-го розчину NaCl (n=30)	12,33±0,56	7,80±0,66***	20 (66,7 %)
Адемолу (n=15)	7,50±0,43*,**	4,60±0,40*,***	5 (33,3 %)*
Цитиколіну (n=20)	9,20±0,42*	4,78±0,40*,***	10 (50,0 %)

Примітка. У дужках значення у відсотках. Тут і в табл. 2 \* $P < 0,05$  порівняно з тваринами, яким вводили фізіологічний розчин, \*\* вірогідність щодо ефекту цитиколіну, \*\*\* вірогідність щодо показника на 4-ту добу.



оді. Експериментальна курсова терапія щурів адемолом краще за цитиколін сприяла зменшенню смертності, розвитку та виразності неврологічних порушень, що супроводжувалося покращенням мнестичних функцій у тварин із ГПМК на 21-шу добу.

Ці результати цілком узгоджуються із даними, які були отримані нами при вивченні впливу адемолу на перебіг нейродеструктивних процесів в ішемізованому головному мозку, про які судили за ступенем активності маркера пошкодження мембранної цілісності нейронів – нейрон-специфічної енолази (NSE) [10]. Згідно з літературними джерелами, суттєве підвищення активності досліджуваного ферменту у крові впродовж перших 4 діб гострої церебральної ішемії, свідчить не тільки про значне порушення цитоархітекτονіки нервової тканини, а й дає змогу з певною вірогідністю передбачити несприятливий прогноз для хворого (летальний кінець, значне погіршення когнітивно-мнестичних функцій, втрату адаптаційних можливостей до навколишнього середовища тощо) [4, 7]. У попередніх наших працях було встановлено, що модельне ГПМК (4-та доба спостереження) супроводжується де-

сятикратним підвищенням активності NSE у крові, що цілком закономірно корелює зі значною летальністю у цей термін ішемії та вищеописаними змінами у неврологічному статусі тварин. Курсова терапія адемолом експериментального ГПМК супроводжувалася зменшенням активності NSE у 2,3 раза відносно групи тварин, яким вводили лише 0,9%-й розчин NaCl. Це знайшло своє віддзеркалення у зменшенні летальності, сприяло регресу неврологічного дефіциту та супроводжувалося покращенням мнестичних функцій у тварин у відновлювальний період церебральної ішемії.

Також ми провели моніторинг основних показників кислотно-лужної рівноваги (КЛР) у венозній крові сагітального синусу головного мозку тварин з ГПМК [9]. На основі отриманих результатів, які свідчили про розвиток в умовах цього патологічного стану декомпенсованого змішаного ацидозу (метаболического та дихального) можна зробити припущення, що порушення у гомеостазі КЛР тканин головного мозку є одним із тригерних факторів у розвитку деструктивно-дегенеративних змін нейронів. Ці результати стосовно провідної ролі змішаного ацидозу на перебіг

**Таблиця 2.** Вплив внутрішньоочеревинного адемолу (2 мг/кг) та цитиколіну (250 мг/кг) на навчання та пам'ять щурів з гострим порушенням мозкового кровотоку на 21-шу добу експерименту за тестом умовної реакції пасивного уникнення ( $M \pm m$ ,  $n=9-10$ )

Група тварин	Латентний період входу в темну камеру, с	
	до навчання	через 24 год після навчання
Інтактні тварини	5,30 $\pm$ 0,30	222,20 $\pm$ 2,68
Церебральна ішемія		
0,9 %-го розчину NaCl	18,70 $\pm$ 0,58 (+352,83 %)	45,80 $\pm$ 2,84 (-79,39 %)
Адемолу	11,60 $\pm$ 0,83* (+118,86 %) [-37,97 %]	115,10 $\pm$ 4,25*^ (-48,20 %) [+151,31 %]
Цитиколіну	10,50 $\pm$ 0,70* (+98,11 %) [-43,86 %]	81,00 $\pm$ 1,88* (-63,55 %) [+76,85 %]

Примітка. У круглих дужках – зміни відносно показника інтактних тварин, у квадратних дужках – відносно показника щурів з ішемією, яким вводили фізіологічний розчин.

гострої церебральної ішемії збігаються з даними інших науковців [12, 21]. Разом з цим введення адемола сприяло відновленню в ішемізованому головному мозку порушених показників КЛР. Це, на нашу думку, може свідчити про нормалізацію в ньому метаболічних процесів і сприяє збереженню морфофункціональних характеристик нейронів.

Аналіз літературних свідчить про головну роль глутаматергічних синапсів мозку не тільки у розвитку ішемічного каскаду (зокрема ацидозу) в умовах ГПМК, а й в реалізації процесів нейродегенерації, навчання й пам'яті [6, 23]. У зв'язку з цим у первинній церебропротекції новим і перспективним напрямком є пошук речовин, здатних перешкоджати наростанню ексайтотоксичності за рахунок повної або часткової блокади NMDA-рецепторів. Їхні антагоністи зменшують потік іонів кальцію в клітину через агоністзалежні кальцієві канали. Препарати, які впливають на NMDA-глутаматні рецептори, поділяються на конкурентні та неконкурентні блокатори. До першої групи належать AP-5, AP-7, CGS-19755 (селфотел), а до другої мексаметан, амантадин, кетамін, магнію сульфат, церестат, фенциклідин [20, 23]. Разом із терапевтичним ефектом (обмеження зони некрозу) більшість антагоністів NMDA-рецепторів (наприклад, селфотел та церестат) викликають грубі побічні ефекти (галюцинації, порушення свідомості, гіперкінези, делірії тощо), що зумовило припинення їх клінічного застосування [18].

Тому в останні роки ведеться інтенсивний пошук високоефективних і безпечних блокаторів NMDA-рецепторів. При цьому слід враховувати, що повна їх інактивація *in vivo* призводить до поширеного апоптозу в ЦНС, що посилює нейродегенеративні процеси та блокує здатність клітин до виживання в умовах ішемії. Зниження активності NMDA-рецепторів попереджає розвиток некрозу нервових клітин та пов'язану з апотозом ексайтотоксичність. Враховуючи, що фізіологічна активність NMDA-рецепторів

необхідна для нормального функціонування нервової тканини, клінічний успіх у терапії ГПМК може бути досягнутий лише за умов використання їхніх антагоністів, які селективно знижують надлишкову активацію. Як показали дані наших попередніх досліджень, до таких речовин можна віднести і адемола [11]. При вивченні фармакологічних характеристик аспартатактивованих струмів та їх модуляції адемолом на окремих пірамідальних нейронах гіпокампа 15-добових білих щурів лінії Вістар WAG\Gsto було встановлено, що ця сполука є низькоафінним неконкурентним антагоністом NMDA-рецепторів, іонофорного комплексу пірамідальних нейронів гіпокампа із дуже швидкою блокадою/деблокадою NMDA-рецепторів. Ця властивість є провідним механізмом церебропротекторної дії досліджуваного похідного адамантану в умовах гострої церебральної ішемії. Адемола за рахунок селективного зниження надлишкової активації NMDA-рецепторів може забезпечувати нормальне функціонування нейронів зони пенумбри при ішемії головного мозку внаслідок зростання середньої тривалості імпульсів повторюваних переходів активованого NMDA-каналу в блоковану форму й назад.

Аналізуючи наведені результати, можна зробити заключення, що описані вище церебропротекторні ефекти адемола в умовах ГПМК зумовлені саме його спроможністю блокувати патологічну активацію глутаматних рецепторів. Отримані результати вказують на перспективність створення на його основі нового засобу для лікування ішемічних уражень головного мозку.

## ВИСНОВКИ

1. Упродовж перших 4 діб модельне гостре порушення мозкового кровообігу у щурів супроводжується значною летальністю, формуванням тяжкого неврологічного дефіциту та погіршенням процесів навчання та пам'яті у відновлювальному періоді (21 доба).

2. Оригінальне похідне адамантану 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанол (умовна назва адемола) значно зменшує летальність шурів і неврологічний дефіцит у гострому та відновлювальному періодах гострого порушення мозкового кровообігу, сприяє покращенню мнестичних функцій.

3. Адемола можна вважати перспективним церебропротектором.

**А.А. Ходаковский**

#### **ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТИВОИШЕМИЧЕСКИХ И МНЕМОТРОПНЫХ СВОЙСТВ АДЕМОЛА ПРИ МОДЕЛЬНОМ ОСТРОМ НАРУШЕНИИ МОЗГОВОГО КРОВОТОКА**

В опытах на крысах с модельным острым нарушением мозгового кровообращения (билатеральная каротидная окклюзия) установлено, что введение производного адамантана 1-адамантилетилокси-3-морфоліно-2-пропанола (условное название адемола) в дозе 2 мг/кг внутривентриально в лечебном режиме (через 1 ч после моделирования инсульта и далее один раз в сутки через каждые 24 ч в течение 21 сут) сопровождается восстановлением мнестических функций и эффективнее по сравнению с цитиколином способствует уменьшению летальности и неврологического дефицита в остром и восстановительном периодах инсульта. Полученные результаты экспериментально обосновывают целесообразность создания на основе адемола отечественного церебропротекторного препарата. Ключевые слова: адемола, цитиколин, острое нарушение мозгового кровообращения, церебропротекция.

**O.A.Khodakovskiy**

#### **CHARACTERISTICS OF ANTIISCHEMIC AND MNEMOTROPIC PROPERTIES OF ADEMOL UNDER MODEL OF ACUTE DISORDER OF ENCEPHALIC CIRCULATION**

In experiments with the rat model of acute disorder of encephalic circulation (bilateral carotid occlusion) it was found that introduction of derivate of adamantan 1-adamantiloxy-3-morpholino-2-propanol (under conventional name ademol) in the dose 2 mg/kg intraabdominal in treatment regimen (in an hour after reconstruction of insult and further 1 time every 24 hours during 21 days) was accompanied by a recovery of mnemotropic properties and is more effective than cytikolin, resulting in a decreased lethality and neurological deficiency in acute and recovery periods of insults. The data received proved the usefulness of development of ademol based cerebroprotective remedy.

Key words: ademol, cytikolin, acute disorder of encephalic circulation, cerebroprotection.

*M.I. Pirogov Vinnitsa Medical University.*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. — М.: Высш. школа, 1991. — 527 с.
2. Зозуля І.С., Лисенко Г.І., Латоха І.О. Сучасний стан проблеми діагностики, перебігу, лікування гострих порушень мозкового кровообігу в поліклінічних умовах // Укр. мед. часопис. — 2011. — 11-12, № 6. — С.30–38.
3. Китаева Э.А., Сайхунов М.В., Хасанова Д.Р. Нейропротективная терапия у больных с полушарным ишемическим инсультом // Казан. мед. журн. — 2009. — № 5. — С.671–675.
4. Королев А.А., Сулова Г.А. Динамика восстановления больных в зависимости от тяжести неврологических нарушений в процессе реабилитационного лечения // Неврол. вестн. — 2009. — 151, № 2. — С. 15–19.
5. Левин О.С. Применение цитиколина в лечении инсульта // Рус. мед. журн. — 2008. — № 26. — С.1772–1777.
6. Никонов В. В., Савицкая И. Б. Роль антагонистов-глутаматных рецепторов (ПК-Мерц) в лечении поврежденных мозга (обзор литературы) // Медицина неотложных состояний. — 2012. — № 5(44). — С. 36–40.
7. Рекомендации по ведению больных с ишемическим инсультом и транзиторными ишемическими атаками (2008) Исполнительный комитет Европейской инсультной организации (ESO) и Авторский комитет ESO // Практ. ангиология. — 2008. — № 4. — С. 9–23.
8. Ходаківський О.А., Степанюк Г.І., Короткий Ю.В., Лозинський М.О. Скринінг церебропротекторного ефекту серед нових похідних адамантану в умовах експериментальної ішемії головного мозку // Фармакологія та лікар. токсикологія. — 2010. — № 3 (16). — С. 8–11.
9. Ходаківський О.А. Вплив курсової експериментальної терапії адемолом (сполукою ЮК-1) на динаміку показників кислотно-лужної рівноваги в ішемізованому головному мозку // Вісн. морфології. — 2010. — 16, № 4. — С.787–790.
10. Ходаківський О.А. Оцінка впливу експериментальної терапії адемолом на інтенсивність перебігу деструктивних змін в мембранах нейронів у монгольських піщанок в умовах гострої церебральної ішемії // Там само. — 2011. — 17, № 1. — С. 62–65.
11. Ходаківський О.А. Порівняльна оцінка впливу похідних адамантану сполук ЮК-1 та ЮК-4 на активність NMDA-рецепторів // Клін. фармація. — 2011. — 15, № 4. — С.60–63.
12. Чекман И.С., Губский Ю.И., Беленичев И.Ф. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов: Метод. рекомендації. — Киев, 2010. — 81 с.
13. Clark W.M., Wechsler L.R., Sabounjian L.A., Schwiderski U.E., for the Citicoline Stroke Study Group A phase III randomized efficacy trial of 2000 mg citicoline in acute ischemic stroke patients // Neurology. — 2001. — 57. — P.1595–1602.

14. Clark W.M., Williams B.J., Selzer K.A. A randomized efficacy trial of citicoline in patients with acute ischemic stroke // *Stroke*. – 2001. – 30. – P.2592–2597.
15. Davalos A., Alvarez-Sabin J., Castillo J. Citicoline in the treatment of acute ischaemic stroke: an international, randomised, multicentre, placebo-controlled study (ICTUS trial) // *Lancet*. – 2012. – 380. – P.349–357.
16. Fisher M., Feuerstein G., Howells D.W., Hurn P.D., Kent Th.A., Savitz S. I., LoE.H. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations // *Stroke*. – 2009. – 40. – P.2244–2250.
17. Jose A. lvarez-Sabnn M.D.;Gustavo C., Roman M.D. Citicoline in vascular cognitive impairment and vascular dementia after stroke // *Ibid*. – 2011. – 42. – P. S40–S43.
18. Kidwell C.S., Liebeskind D.S., Starkman S. Trends in acute ischemic stroke trials through the 20th century // *Ibid*. – 2001. – 32 (6). – P. 1349–1359.
19. McGrow C.P. Experimental cerebral infarction effects of pentobarbital in mongolian gerbils // *Arch. Neurol.* – 1977. – 34, № 6. – P.334–336.
20. Meloni B.P., Zhu H., Knuckey N.W. Magnesium neuroprotective following global and focal cerebral ischaemia? A review of published studies // *Magnes. Res.* – 2006. – 19(2). – P. 123–137.
21. Pandya R.S., Mao L., Zhou H. Central nervous system agents for ischemic stroke: Neuroprotection mechanisms // *Med. Chem.* – 2011. – 1, № 27. – P. 56–59.
22. Saver J., Wilterdink J. Choline precursors in acute and subacute stroke: a meta-analysis // *Stroke*. – 2002. – 33. – P.353.
23. Shibuta S., Varathan S., Mashimo T. Ketamine and thiopental sodium: individual and combined neuroprotective effects on cortical cultures exposed to NMDA or nitric oxide // *Brit. J. Anaesth.* – 2006. – 97, № 4. – P.517–524.

Вінницьк. мед. ун-т ім. М.І. Пирогова  
E-mail: [aleksey.hodakovskiy@bk.ru](mailto:aleksey.hodakovskiy@bk.ru)

Матеріал надійшов  
до редакції 19.12.2012

Я. В. Лесик, Р. С. Федорук, О. П. Долайчук

## Імунобіологічні показники крові за умов додавання до раціону кролів суспензії хлорели, сульфату натрію, цитрату та хлориду хрому

*Досліджували вміст глікопротеїнів та їх окремих вуглеводних компонентів, фагоцитарну активність нейтрофілів, фагоцитарний індекс, фагоцитарне число, лізоцимну і бактерицидну активність сироватки крові, концентрацію циркулюючих імунних комплексів і молекул середньої маси у крові кролів за умов введення у раціон суспензії хлорели, сульфату натрію, цитрату і хлориду хрому. Дослідження проведені на кролематках масою 3,7–3,9 кг з приплодом від 1-ї доби молочного періоду до 118-добового віку, розділених на п'ять груп: контрольну і чотири дослідні. Встановлено, що у крові кролів дослідних груп, які додатково споживали в раціоні сульфат натрію, хлорид і цитрат хрому, вміст глікопротеїнів та їх вуглеводних компонентів був вірогідно вищим упродовж 118 днів дослідження порівняно з контрольною групою. Показано, що згодовування мінеральних добавок кролям дослідних груп позначилося вірогідними різницями порівняно з контролем показників неспецифічної резистентності у крові за періодами дослідження, що було більше вираженим у перші два місяці життя.*

*Ключові слова:* кролі, хром, сірка, імунобіологічні показники крові.

### ВСТУП

Стан імунобіологічної реактивності організму тварин має важливе значення у формуванні та функціонуванні його клітинних і гуморальних ланок неспецифічної резистентності [9, 10]. У системі оцінки функціонального стану імунної системи важливим є визначення вмісту в крові глікопротеїнів, оскільки більшість імунних білків є головними у біосинтезі та фізіологічній активності протеїнів, що беруть участь у розпізнаванні антигенів [1, 12]. Коливання вмісту глікопротеїнових комплексів у крові може виявляти відповідь організму на дію стресу і розвиток патологічних процесів [13], вони відіграють провідну роль у зв'язуванні та виведенні ксенобіотиків [11], а також мають імуномодулювальну [4] й антиоксидантну властивості [3]. Порушення обміну глікопротеїнів спричиняє складні зміни функцій на клітинному, тканинному та системному рівнях. Відомо, що сіалові

кислоти, завдяки прикінцевому положенню в молекулі глікопротеїнів і негативному заряду, відіграють ключову роль в адгезії клітин, їх диференціації та проліферації [13]. Вміст глікопротеїнів та їх вуглеводних компонентів в крові і показники неспецифічної резистентності організму тварин можуть виражати його імунобіологічну реакцію на дію технологічних стрес-факторів і виявляти певні залежності з іншими показниками системи імунного захисту. Разом з тим сучасні інтенсивні технології у кролівництві передбачають раннє відлучення кроленят від кролематки, що є своєрідним стресовим чинником, який призводить до зменшення продуктивності, порушення процесів травлення, зниження резистентності та стійкості тварин до захворювань [6]. Тому метою нашої роботи було оцінити зміни імунобіологічних показників крові за умов додавання до раціону кролів суспензії хлорели, сульфату натрію, цитрату і хлориду хрому.

© Я.В. Лесик, Р.С. Федорук, О.П. Долайчук



## МЕТОДИКА

Дослідження проведені на кролематках масою тіла 3,7–3,9 кг з приплодом від 1-ї доби молочного періоду до 118-добового віку, отриманих від кролиць-сестер, породи сріблястий, розділених на п'ять груп: контрольну і чотири дослідні. Кролицям контрольної (I) групи згодовували повнораціональний гранульований комбікорм з вільним доступом до води. Самиці II групи, крім комбікорму з першої доби після окролу з водою отримували суспензію хлорели штаму *Chlorella vulgaris* BIN у співвідношенні (1:3), з розрахунку 90–110 мл/тварину за добу. Тваринам III групи, аналогічно схемі II групи, згодовували комбікорм, а з водою крім хлорели випоювали сульфат натрію з розрахунку 40,0 мг/кг маси тіла або в кількості 0,15–0,17 г S/тварину за добу. Самиці з кролятами IV групи отримували комбікорм і воду за схемою III групи з додатковим випоюванням з водою  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , в кількості 28–32 мкг Cr/тварину за добу з розрахунку 7,6 мкг/кг маси тіла. Тварини V групи отримували комбікорм і воду відповідно до схеми III групи з додатковим введенням у воду цитрату хрому, отриманого методом Косінова, Каплуненка з використанням нанотехнологій [8] з розрахунку 2,2 мкг Cr/кг маси тіла або 8–12 мкг Cr/тварину за добу. Кролиць утримували в сітчастих одноярусних клітках у приміщеннях з регульованим мікрокліматом разом з кролятами до 45-добового віку, а після відлучення від кролематок – групами по 6 тварин (окремо самці і самиці). Зразки крові для біохімічних досліджень відбирали з крайової вušної вени кролів на 46-ту і 118-ту доби життя. У крові визначали компоненти глікопротеїнових комплексів – вміст фукози за методом Діше, гексоз, зв'язаних з білками, та сероглікоїдів – орциновим методом, сіалових кислот – за Свеннерхольмом, церулоплазміну – методом Равіна, а також фагоцитарну активність нейтрофілів, фагоцитарний індекс, фагоцитарне число, лізоцимну активність, бактерицидну

активність сироватки крові, вміст циркулюючих імунних комплексів і молекул середньої маси за прийнятими у біології методиками [2]. Цифрові результати опрацьовані статистично з використанням критерію t Ст'юдента та комп'ютерної програми.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Застосування у раціоні кролів упродовж дослідного періоду суспензії хлорели, сірки та сполук хрому впливало на вміст вуглеводних компонентів глікопротеїнів у їх крові (табл. 1). Зокрема, концентрація гексоз, зв'язаних з білками у крові кролів III, IV і V груп, була вірогідно вищою на всіх етапах дослідження порівняно з контрольною групою. У крові тварин II групи, яким випоювали суспензію хлорели, значення цього показника не зазнавали вірогідних змін, проте виявлялася тенденція до зростання за періодами дослідження порівняно з контролем. Вміст сероглікоїдів у цих групах був вищим на 9,0; 9,1 і 13,6 % відповідно на 46-ту добу та вірогідно збільшувався на 118-ту добу життя порівняно з контрольною групою. Вірогідне підвищення вмісту гексоз та сероглікоїдів у крові кролів дослідних груп може свідчити про фізіологічну здатність застосованих добавок у досліджуваних кількостях посилювати імунобіологічні реакції та підвищувати неспецифічний імунітет у кролів як під час відлучення від кролематок, так і після цього періоду. Доведено, що глікопротеїни займають важливе місце в активації імунної відповіді організму тварин [5].

Відомо, що гаптоглобін, як глікопротеїд плазми крові, має специфічну властивість зв'язувати гемоглобін у стабільний комплекс Нр-Нб і посилювати імунобіологічну реактивність організму [14]. Упродовж дослідного періоду в крові кролів III, IV і V груп відзначено вірогідне зростання концентрації гаптоглобіну порівняно з контрольною групою. Отже, це посилює позитивний вплив сульфату натрію, хлориду та цитрату хрому на

**Таблиця 1. Вміст глікопротеїнів та їх вуглеводних компонентів у крові кролів за періодами дослідження (M±m, n=4)**

Групи тварин	Згодовування добавок	
	46-та доба	118-та доба
Гексози, зв'язані з білками, г/л		
Контроль (I)	1,26 ± 0,02	1,36 ± 0,03
Дослідні тварини, які отримували суспензію хлорели (II)	1,29 ± 0,01	1,32 ± 0,02
сульфат натрію (III)	1,34 ± 0,02 *	1,50 ± 0,03 **
хлорид натрію (IV)	1,31 ± 0,01 *	1,45 ± 0,02 *
цитрат хрому (V)	1,34 ± 0,02 *	1,44 ± 0,02 *
Сероглікоїди, г/л		
Контроль (I)	0,22 ± 0,002	0,26 ± 0,004
Дослідні тварини, які отримували суспензію хлорели (II)	0,22 ± 0,002	0,27 ± 0,002 *
сульфат натрію (III)	0,24 ± 0,004 **	0,28 ± 0,003 **
хлорид натрію (IV)	0,24 ± 0,002 ***	0,30 ± 0,007 **
цитрат хрому (V)	0,25 ± 0,003 ***	0,29 ± 0,006 **
Гаптоглобін, г/л		
Контроль (I)	1,23 ± 0,01	1,26 ± 0,04
Дослідні тварини, які отримували суспензію хлорели (II)	1,26 ± 0,05	1,28 ± 0,02
сульфат натрію (III)	1,46 ± 0,02 ***	1,44 ± 0,02 **
хлорид натрію (IV)	1,44 ± 0,01 ***	1,42 ± 0,01 **
цитрат хрому (V)	1,43 ± 0,04 ***	1,47 ± 0,01 **
Сіалові кислоти, ум.од.		
Контроль (I)	86,0 ± 0,08	88,3 ± 3,20
Дослідні тварини, які отримували суспензію хлорели (II)	89,0 ± 2,67	89,3 ± 1,49
сульфат натрію (III)	95,5 ± 0,64 ***	108,3 ± 2,93 **
хлорид натрію (IV)	94,7 ± 0,62 ***	106,3 ± 3,79 *
цитрат хрому (V)	97,7 ± 0,85 ***	109,0 ± 1,68 **
Фукоза, мг%		
Контроль (I)	3,32 ± 0,06	3,22 ± 0,03
Дослідні тварини, які отримували суспензію хлорели (II)	3,36 ± 0,08	3,42 ± 0,06
сульфат натрію (III)	3,88 ± 0,06 ***	3,67 ± 0,03 ***
хлорид натрію (IV)	3,73 ± 0,05 **	3,49 ± 0,04 **
цитрат хрому (V)	3,77 ± 0,07 **	3,65 ± 0,05 ***
Церулоплазмін, ум.од.		
Контроль (I)	335,7 ± 1,65	315,2 ± 5,96
Дослідні тварини, які отримували суспензію хлорели (II)	340,7 ± 5,33	321,7 ± 2,17
сульфат натрію (III)	37,7 ± 1,84 ***	338,2 ± 2,25
хлорид натрію (IV)	353,0 ± 2,27 ***	365,5 ± 2,25 ***
цитрат хрому (V)	361,7 ± 2,50 ***	336,2 ± 4,13 *

Примітка. Тут і в табл. 2 і 3 \*P&lt;0,05; \*\*P&lt;0,01; \*\*\*P&lt;0,001 відносно контролю.

гемопоетичну та імуномодулювальну функцію організму кролів, що було відзначено для гексоз, зв'язаних з білками, та сероглікоїдів.

Вміст сіалових кислот і фукози вірогідно підвищувався на 46-ту і 118-ту доби життя у крові кролів III, IV і V груп порівняно з контролем. Це може свідчити про стимулювальну дію мінеральних добавок на метаболізм у клітинах крові та посилення реактивності їх організму.

Вміст церулоплазміну в крові тварин III, IV і V груп на першому етапі дослідження був вищим на 6,5; 5,1 і 7,7 % відповідно ( $P<0,001$ ), ніж у кролів контрольної групи. На 118-ту добу у крові тварин IV і V груп значення цього показника були вищими на 15,9 і 6,6 % порівняно з контролем. Підвищення концентрації церулоплазміну в крові кролів, які споживали сульфат натрію, хлорид та цитрат хрому, можуть вказувати на посилення метаболічних процесів в їх організмі з активацією окисно-відновних реакцій та підвищенням антиоксидантного захисту [3].

За результатами аналізу показників неспецифічної резистентності відзначено, що фагоцитарна активність нейтрофілів крові кролів дослідних груп була вірогідно вищою порівняно з контролем (табл. 2). Так, у крові кролів II, III, IV і V груп цей показник вірогідно зростав на 13,3; 24,2; 25,1 і 29,3 % відповідно у першому періоді дослідження і на 8,4; 7,2; 6,7 та 14,5 % на завершальному етапі вживання добавок порівняно з контрольною групою. Фагоцитарний індекс і фагоцитарне число виявляли позитивну кореляцію зі значенням активності фагоцитозу. Відомо, що фагоцитоз є першою стадією імунної реакції організму, в результаті чого видозмінюється антиген з утворенням антигенних детермінант. Це посилює імуногенез і забезпечує збереження антигена на клітинній мембрані у легкодоступній формі [7]. Отже, на основі цих результатів можна стверджувати, що введення до раціону кролів мінеральних добавок сприяло активації формування клітинних механізмів захисту їх організму.

Визначення гуморальних факторів неспецифічного захисту організму, з дослідженням сироватки крові, вказують також на стимулювальний вплив застосованих добавок у раціоні кролів на її лізоцимну активність. Зокрема, у крові кролів II, III, IV і V груп на 46-ту добу згодовування добавок відзначено вірогідне підвищення цього показника, тоді як на 118-ту добу у тварин III, IV і V груп відзначено тенденцію до підвищення на 6,8; 9,0 і 10,6 % відповідно порівняно з контрольною групою. Це може вказувати на позитивний вплив застосованих добавок, особливо сульфату натрію та хлориду і цитрату хрому в раціоні кролів на активацію гуморальних чинників резистентності та імунобіологічної здатності їх організму, що відзначено й за іншими показниками. Відомо, що ферментативна активність лізоциму зумовлена руйнуванням зв'язку між N-ацетилнейраміновою кислотою та N-ацетилглюкозаміном у мукополісахаридах. Утворені глюкوپептиди стимулюють синтез антитіл, підвищують цитотоксичну активність [7], що більше було виражено у крові кролів дослідних груп на 46-ту добу згодовування добавок.

Бактерицидна активність сироватки крові характеризувалася найвищими вірогідними різницями між контрольною та дослідними групами впродовж усього періоду дослідження. Так, у крові кролів II, III, IV і V груп цей показник зростав на 16,9; 26,9; 26,6 і 37,2 % відповідно ( $P<0,001$ ) на 46-ту добу дослідження і був вищим на 38,6; 63,1; 51,9 і 61,2 % ( $P<0,01$ ) на 118-ту добу порівняно з контролем. Вірогідні різниці показників бактерицидної активності сироватки крові між контрольною та дослідними групами корелюють з міжгруповими відмінностями інших показників резистентності і можуть вказувати на підвищення імунітету кролів, особливо гуморальної ланки неспецифічного захисту їх організму за дії застосованих кількостей добавок. Цей вплив добре виражений упродовж усього періоду вирощування кролів до 118-добового віку, особливо у період дії

технологічного стресу під час відлучення кроленят від кролематки.

Вміст циркулюючих імунних комплексів у крові кролів III, IV і V груп на 46-ту добу застосування добавок зростав на 85,0; 84,0 і 56,5 % відповідно і на 118-ту добу у всіх дослідних групах був вищим на 18,5; 49,9; 59,5 і 36,3 % порівняно з контролем (табл. 3). Підвищення значень цього показника можна пояснити позитивним впливом добавок,

особливо сполук хрому, оскільки відомо, що хром підсилює ефекти інсуліну, впливає на вуглеводний, ліпідний і білковий обмін та функціональний стан системи захисту їх організму і, зокрема, його імунобіологічну реактивність. При цьому дія інсуліну посилюється без зміни вмісту самого гормону, вона повністю залежить від вмісту хрому [15].

Концентрація молекул середньої маси у крові кролів усіх дослідних груп зроста-

**Таблиця 2. Показники неспецифічної резистентності організму кролів за періодами дослідження ( $M \pm m$ ,  $n=4$ )**

Групи тварин	Згодовування добавок	
	46-та доба	118-та доба
Фагоцитарна активність нейтрофілів, %		
Контроль (I)	9,83 $\pm$ 0,83	48,25 $\pm$ 0,85
Дослідні тварини, які отримували суспензію хлорели (II)	45,16 $\pm$ 1,19 **	52,33 $\pm$ 1,45 *
сульфат натрію (III)	49,50 $\pm$ 1,47 ***	51,75 $\pm$ 0,85 *
хлорид натрію (IV)	49,83 $\pm$ 0,47 ***	51,50 $\pm$ 0,86 *
цитрат хрому (V)	51,50 $\pm$ 1,08 ***	55,25 $\pm$ 1,25 **
Фагоцитарний індекс, од.		
Контроль (I)	8,47 $\pm$ 0,29	9,25 $\pm$ 0,22
Дослідні тварини, які отримували суспензію хлорели (II)	9,04 $\pm$ 0,22	9,45 $\pm$ 0,55
сульфат натрію (III)	9,14 $\pm$ 0,20	9,51 $\pm$ 0,31
хлорид натрію (IV)	9,43 $\pm$ 0,27 *	9,70 $\pm$ 0,48
цитрат хрому (V)	9,27 $\pm$ 0,36	9,46 $\pm$ 0,23
Фагоцитарне число, од.		
Контроль (I)	3,36 $\pm$ 0,08	4,63 $\pm$ 0,20
Дослідні тварини, які отримували суспензію хлорели (II)	4,08 $\pm$ 0,11 ***	4,91 $\pm$ 0,23
сульфат натрію (III)	4,53 $\pm$ 0,09 ***	4,90 $\pm$ 0,21
хлорид натрію (IV)	4,70 $\pm$ 0,13 ***	4,82 $\pm$ 0,21
цитрат хрому (V)	4,63 $\pm$ 0,27 **	5,22 $\pm$ 0,19 *
Лізоцимна активність, %		
Контроль (I)	43,66 $\pm$ 0,91	46,33 $\pm$ 0,88
Дослідні тварини, які отримували суспензію хлорели (II)	50,0 $\pm$ 0,68 ***	48,0 $\pm$ 0,57
сульфат натрію (III)	51,33 $\pm$ 1,14 ***	49,51 $\pm$ 0,86 *
хлорид натрію (IV)	52,66 $\pm$ 0,95 ***	50,50 $\pm$ 1,55 *
цитрат хрому (V)	54,0 $\pm$ 1,21 ***	51,25 $\pm$ 1,88 *
Бактерицидна активність сироватки крові, %		
Контроль (I)	40,54 $\pm$ 0,72	36,01 $\pm$ 2,94
Дослідні тварини, які отримували суспензію хлорели (II)	47,39 $\pm$ 1,24 ***	49,93 $\pm$ 1,51 **
сульфат натрію (III)	51,47 $\pm$ 1,76 ***	58,76 $\pm$ 4,03 **
хлорид натрію (IV)	51,34 $\pm$ 0,66 ***	54,71 $\pm$ 4,01 **
цитрат хрому (V)	55,65 $\pm$ 2,84 ***	58,08 $\pm$ 4,58 **

Таблиця 3. Імунологічні показники крові кролів за періодами дослідження ( $M \pm m$ ,  $n=4$ )

Групи тварин	Згодовування добавок	
	46-та доба	118-та доба
Циркуючі імунні комплекси, од. екстикції		
Контроль (I)	20,0 $\pm$ 1,15	36,7 $\pm$ 2,60
Дослідні тварини, які отримували суспензію хлорели (II)	22,7 $\pm$ 1,76	43,5 $\pm$ 2,02*
сульфат натрію (III)	37,0 $\pm$ 1,0 ***	55,0 $\pm$ 0,57 **
хлорид натрію (IV)	36,8 $\pm$ 0,88 ***	58,5 $\pm$ 0,28 **
цитрат хрому (V)	31,3 $\pm$ 0,66 **	50,0 $\pm$ 2,88 *
Молекули середньої маси, г/л		
Контроль (I)	0,386 $\pm$ 0,02	0,448 $\pm$ 0,02
Дослідні тварини, які отримували суспензію хлорели (II)	0,426 $\pm$ 0,03	0,558 $\pm$ 0,02 **
сульфат натрію (III)	0,480 $\pm$ 0,01 *	0,561 $\pm$ 0,02 *
хлорид натрію (IV)	0,527 $\pm$ 0,04 *	0,581 $\pm$ 0,02 **
цитрат хрому (V)	0,401 $\pm$ 0,09	0,501 $\pm$ 0,02

ла за періодами дослідження порівняно з контролем. Вірогідно вище значення цього показника відмічено у крові кролів III і IV груп на 46-ту добу життя, тоді як у II, III і IV групах – на 118-ту добу дослідження. Ці результати корелюють зі вмістом циркулюючих імунних комплексів і можуть свідчити про коригувальний вплив добавок сірки і тривалентного хрому, а на завершальному етапі дослідження ще й суспензії хлорели на стан імунної системи та імунобіологічну реактивність організму кролів у період вирощування.

## ВИСНОВКИ

1. У крові кролів дослідних груп, яким згодовували сульфат натрію та його поєднання з хлоридом і цитратом хрому відзначено вірогідно вищу концентрацію глікопротеїнів та їх вуглеводних компонентів на 46-ту і 118-ту доби згодовування добавок порівняно з контрольною групою.

2. Додавання до раціону кролів сірки та сполук хрому зумовлювало активну імунобіологічну реакцію їхнього організму з вірогідним збільшенням фагоцитарної активності нейтрофілів, лізоцимної активності, бактерицидної активності сироватки крові, ніж випоювання суспензії хлорели тваринам II дослідної та контрольної груп.

**Я. В. Лесик, Р. С. Федорук, А. П. Долайчук**

## ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ В УСЛОВИЯХ ДОБАВЛЕНИЯ В РАЦИОН КРОЛИКОВ СУСПЕНЗИИ ХЛОРЕЛЛЫ, СУЛЬФАТА НАТРИЯ, ЦИТРАТА И ХЛОРИДА ХРОМА

Исследовали содержание гликопротеинов и их отдельных углеводородных компонентов, фагоцитарную активность нейтрофилов, фагоцитарный индекс, фагоцитарное число, лизоцимную и бактерицидную активность сыворотки крови, концентрацию циркулирующих иммунных комплексов и молекул средней массы в крови кроликов при введении в рацион суспензии хлореллы, сульфата натрия, цитрата и хлорида хрома. Исследования проведены на крольчихах массой тела 3,7–3,9 кг с приплодом от 1-х суток молочного периода до 118-суточного возраста, разделенных на пять групп: контрольную и четыре опытных. Установлено, что в крови кроликов опытных групп, которые дополнительно потребляли в рационе сульфат натрия, хлорид и цитрат хрома, содержание гликопротеинов и их углеводных компонентов было достоверно выше в течение 118 сут по сравнению с контрольной группой. Показано, что скармливание минеральных добавок кроликам опытных групп отразилось вероятными разностями, по сравнению с контрольной, показателей неспецифической резистентности в крови по периодам исследования и было более выраженным в первые два месяца жизни.

Ключевые слова: кролики, Хром, Сера, иммунобиологические параметры крови.



Ya. V. Lesyk, R. S. Fedoruk, O. P. Dolaychuk

# IMMUNOBIOLOGICAL BLOOD PARAMETERS IN RABBITS AFTER ADDITION TO THE DIET SUSPENSIONS OF CHLORELLA, SODIUM SULFATE, CITRATE AND CHROMIUM CHLORIDE

We studied the content of glycoproteins and their individual carbohydrate components, the phagocyte activity of neutrophils, phagocyte index, phagocyte number lizotsym and bactericidal activity of the serum concentration of circulating immune complexes and middle mass molecules in the blood of rabbits following administration into the diet chlorella suspension, sodium sulfate, chromium citrate and chromium chloride. The studies were conducted on rabbits weighing 3,7 – 3,9 kg with altered diet from the first day of life to 118 days old. Rabbits were divided into five groups: the control one and four experimental groups. We found that in the blood of rabbits of experimental groups recieved sodium sulphate, chromium chloride and chromium citrate, the content of glycoprotein's and their carbohydrate components was significantly higher during the 118 days of the study compared with the control group. Feeding rabbits with mineral supplements likely reflected the differences compared with the control parameters of nonspecific resistance in the blood for the study period, which was more pronounced in the first two months of life. Key words: rabbits, chromium, sulfur, immunological parameters of blood.

*Institute of animal biology NAS of Ukraine, Lviv*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Башенко М.І., Гончар О.Ф., Шевченко Є.А. Кролівництво. – Черкаси: Черкас. ін-т АПВ, 2011. – 302 с.
2. Влізлю В.В., Федорук Р.С., Ратич І.Б. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині. – СПОЛЮМ, 2012. – 764 с.
3. Ващенко В.І., Ващенко Т.Н. Церулоплазмин – от метаболита до лікарственного средства // Психофармакология, биология, наркология. – 2006. – 6, № 3. – С. 1254–1269.
4. Зорин Н.А., Зорина В.Н., Зорина Р.М. Роль альфа-

- 2-макроглобулина при онкологических заболеваниях // Вопр. онкологии. – 2004. – 50, № 5. – С. 515–519.
5. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – М.: МЕДпресс-информ, 2004. – 920 с.
6. Лактионов К.С. Физиология питания кроликов и пути повышения степени использования кормов. – Орел: Изд-во Орел ГАУ, 2007. – 120 с.
7. Маннапова Р.Р., Подушкина М.А. Иммунная система пушных зверей и кроликов. Современные иммунофизические проблемы развития животных при ассоциативных инфекционно-инвазионных заболеваниях и использование для их профилактики биологически активных продуктов пчеловодства // Сб. науч. тр. – М.: 2001. – С. 296–311.
8. Патент України на корисну модель № 38391. Спосіб отримання карбоксилатів металів «Нанотехнологія отримання карбоксилатів металів» // Косінов М.В., Каплуненко В.Г. / МПК (2006): C07C 51/41, C07F 5/00, C07F 15/00, C07C 53/126 (2008.01), C07C 53/10 (2008.01), A23L 1/00, B82B 3/00. Опубл. 12.01.2009, бюл. № 1/2009.
9. Тесля М.А. Кормление кроликов. – Суч. вет. мед. – 2012. – № 1. – С. 60–64.
10. Чумаченко В. Ю., Чумаченко В.В., Павленко О.А. Резистентність тварин і фактори, що впливають на її стан. Дослідження імунної системи. Фактори, що впливають на резистентність тварин // Вет. медицина України. – 2004. – № 4. – С. 26–29.
11. Fournier T. Medjoubi N., Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein // Biochem. Biophys. Acta, 2000. – 1482, № 1–2. – P. 157–171.
12. Huntoon K., Wang Y., Epplito Ch. The acute phase protein haptoglobin regulates host immunity // J. Leukocyte Biol. – 2008. – 84, № 1. – P. 170–181.
13. Lowe J. B. Glycosylation, immunity and autoimmunity // Cell. – 2001. – 104, № 6. – P. 809–812.
14. Thompson G.M., Cantwell J., Cornell C., Turner G.A. Abnormally fucosylated haptoglobins a cancer marker from tumor burden but not gross liver metastasis // Brit. J. Cancer, 1991. – 64, № 2. – P. 386–390.
15. Vincent J.B. The Nutritional Biochemistry of Chromium (III). – Dep. of Chem. the Univ. of Alabama Tuscaloosa, USA, 2007. – P. 71–85.

*Ин-т біології тварин НААН України, Львів*  
E-mail:

*Матеріал надійшов до редакції 14.03.2013*

С.А. Таланов, Т.І. Ляшенко, І.І. Паталах

## Роль NADPH-оксидази в паракринній та аутокринній регуляції функціональної активності тромбоцитів

*NADPH-оксидаза (NOX) – трансмембранний ензим, нещодавно виявлений у тромбоцитах, має важливе значення для регуляції клітинних сигнальних шляхів. Активність NOX тромбоцитів контролюється агоністами рецепторів, дія яких підпадає під модулювальний вплив NOX. У цьому огляді увагу зосереджено на оцінці участі останнього в аутокринній та паракринній регуляції процесів активації, агрегації, секреції, синтезу білків і рекрутування тромбоцитів під час утворення тромбу. Обговорюється можливість залучення NOX до формування комунікативного зв'язку між сусідніми клітинами, а також до регуляції узгодженої відповіді субпопуляції тромбоцитів на тромбогенний стимул.*

*Ключові слова: тромбоцити, NADPH-оксидаза, рецептори, редокс-сигналізація.*

### ВСТУП

Тромбоцити відіграють важливу роль у підтриманні гемостазу, репарації судинної стінки та розвитку тромбозів у разі порушення механізмів тромбоутворення. За звичайних умов тромбоцит циркулює у кровотоці в неактивному стані, не вступаючи в контакт з іншими клітинами. Під дією гемодинамічного удару чи інших пошкоджень ендотелію вмикаються гемостатичні механізми, спрямовані на попередження крововиливів і репарацію судинної стінки. Тромбоцити активуються, фіксуються в місці пошкодження, утворюють нерозчинні згустки та продукують гуморальні регулятори гемостазу. Отже, ініціація тромбоутворення супроводжується зміною функціонального стану тромбоцитів, які набувають здатності до адгезії, агрегації та секреції біологічно активних сполук. Система активації тромбоцитів потребує складної регуляції, модулюється численними факторами та координує різні клітинні сигнальні шляхи. На відміну від інших клітин тромбоцити не мають ядра, тому не можуть формувати клітинну від-

повідь на рівні регуляції генів-виконавців. Утім, вони зберігають здатність до білкового синтезу за участю мРНК мегакаріоцитів, частина клітинних білків існує в секреторних гранулах як резервний пул. Регуляторні механізми залучення цих білків до підтримки функціональної активності тромбоцитів нині ретельно вивчаються [22, 24, 28]. Зокрема, накопичуються експериментальні дані щодо важливої ролі активних форм кисню (АФК) та азоту (АФА) як медіаторів вхідних та вихідних сигналів, задіяних у змінах функціонального стану тромбоцитів через аутокринні та паракринні механізми регуляції сигнальних білків та білків-рецепторів [9, 10, 12, 27]. По новому висвітлюється роль NADPH-оксидази (NOX), нещодавно виявленої на плазматичній мембрані тромбоцитів.

NOX тромбоцитів належить до унікальної родини оксидоредуктаз, які транспортують електрони через плазматичні мембрани та продукують супероксид-аніон ( $\cdot\text{O}_2^-$ ). На відміну від фагоцитувальних клітин, NOX тромбоцитів утворює  $\cdot\text{O}_2^-$  у низьких концентраціях, недостатніх для забезпечення бакте-

рицидної функції. Донедавна, функціональне призначення цієї властивості тромбоцитів та інших нефагоцитувальних клітин залишалося неясним. Нині з'явилася значна кількість фактів, підтверджених експериментально, які свідчать про важливу участь NOX у регуляції активації тромбоцитів. Зокрема, доведено, що активність NOX тромбоцитів контролюється агоністами рецепторів, дія яких у свою чергу підпадає під модулювальний вплив NOX [5, 6, 8, 32, 33]. У цьому огляді увагу зосереджено на особливостях регуляторної дії NOX на сигналізацію тромбоцитів як без'ядерних клітин, а також розглянуто шляхи залучення NOX до аутокринної та паракринної регуляції взаємодії агоніста та рецептора під час активації тромбоцитів, її впливу на агрегацію та рекрутування інтактних клітин до процесу тромбоутворення.

Структура та функції NOX тромбоцитів. Докази щодо експресії NOX у тромбоцитах уперше з'явилися на початку 90-х, коли було доведено, що дифенілен йодонію хлорид (від англ. diphenylene iodonium chloride, DPI) – низькоспецифічний інгібітор флавіновмісних ферментів – пригнічує агрегацію тромбоцитів [31]. Пізніше кількома незалежними групами дослідників було виявлено гальмування продукції  $\cdot\text{O}_2^-$  в тромбоцитах під дією DPI. Наявність NOX у лізатах тромбоцитів була підтверджена ідентифікацією її субодиниць: спочатку p22<sup>phox</sup> і p67<sup>phox</sup> [21, 32], а пізніше gp91<sup>phox</sup> та p47<sup>phox</sup> [26, 29]. Доведено, що каталітична субодиниця gp91<sup>phox</sup> (ізоформа NOX2) та регуляторна субодиниця p22<sup>phox</sup> утворюють ензиматично активний домен цитохрому b558, резидентно розташований на плазматичній мембрані [4]. Локалізацію NOX підтверджено в дослідях з апоцініном – інгібітором асоціації її цитозольних субодиниць з мембранними [4], яка здійснюється в процесі активації тромбоцита. Зокрема, внаслідок дії зовнішнього стимулу дві цитозольні регуляторні субодиниці p47<sup>phox</sup> та p67<sup>phox</sup> та маленький G-протеїн Ras транслокуються на внутрішню поверхню

плазматичної мембрани з наступною їхньою асоціацією з цитохромом b558. Переміщення p47<sup>phox</sup> на мембрану є також сигналом для приєднання до NOX2 маленької цитозольної субодиниці p40<sup>phox</sup>. Асоційовані субодиниці утворюють активний ензимний комплекс, здатний генерувати  $\cdot\text{O}_2^-$  у примембранному просторі завдяки перенесенню електронів з цитозольного NADPH (донор електронів) на екзосайти NOX. На цьому етапі відбувається одноелектронне відновлення молекул кисню, тимчасово приєднаних до гем у білкового комплексу NOX:



Слід зазначити, що NOX2 є індукцибельним ензимом [13, 19]. Оскільки тромбоцити є без'ядерними клітинами, додаткова експресія NOX2 відбувається на посттранскрипційному рівні. Нещодавно було встановлено, що тромбоцити здатні протягом певного часу зберігати білоксинтетичний потенціал завдяки наявності великого пулу відповідних мРНК та діючих полірибосом. Зокрема, NOX, продукуючи  $\text{H}_2\text{O}_2$ , підсилює експресію власної субодиниці p22<sup>phox</sup>, що забезпечує пролонговану активацію ензиму [1]. Активаторами NOX є також фактори росту та індуктори запалення, хемотактичні пептиди, форболові ефіри та опсонізовані частки [4].

На відміну від імунокомпетентних клітин (нейтрофіли, лімфоцити), де NOX утворює  $\cdot\text{O}_2^-$  у високій концентрації (до 0,1 моль/л). Концентрація утвореного  $\cdot\text{O}_2^-$  у тромбоцитах значно нижча ( $10^{-6}$  моль/л) і недостатня для виконання бактерицидної функції [20, 21].

Численними дослідженнями встановлено, що фізіологічна функція NOX2 полягає в регуляції редоксчутливих сигнальних шляхів згенерованими нею АФК, які модулюють амплітуду і напрямок редокс-сигналів [16, 25]. Унікальність NOX як рецептора полягає в здатності розпізнавати зовнішні стимули, які дуже розрізняються за природою та інтенсивністю. Встановлено, що NOX реагує на широкий спектр хімічних, фізичних і біологічних факторів [16]. Вважають, що її

основна функція – це генерування «сигналу тривоги», який змушує клітини або адаптуватися до умов стресу, або перейти до апоптозу. Механізм специфічного розпізнавання природи стимулу й адекватні зміни активності NOX пов'язують зі здатністю до диференційованої експресії її окремих субодиниць. Цитокіни, фактори запалення, гормони, фізичні фактори та фармакологічні сполуки можуть здійснювати up- чи down-регуляцію рівня mRNA окремих субодиниць NOX через сенсорний білок протеїнкіназу С та NF- $\kappa$ B-залежний сигнальний шлях [17].

Первинним медіатором такого сигналу є  $\cdot\text{O}_2^-$ , який накопичується у позамембранному просторі та швидко перетворюється на перекис водню у реакціях спонтанної або СОД-залежної дисмутації. Новоутворений  $\text{H}_2\text{O}_2$  як більш стабільна АФК здатний змінювати редокс-потенціал плазми. Втім, частина перекису обов'язково повертається до клітини, долаючи плазматичну мембрану за допомогою дифузії або аніонного транспорту (рис. 1).

Включаючись у редоксзалежну клітинну сигналізацію,  $\text{H}_2\text{O}_2$  може безпосередньо інгібувати тирозинові протеїнфосфатази, активувати тирозинові протеїнкінази та деякі редоксчутливі фактори транскрипції, модулювати функції іонних каналів [4].

Аутокринна регуляція активності NOX тромбоцитів. Показано [2], що приєднання ліганду (зокрема, тромбіну чи колагену) до активованого рецептора призводить до фосфорилування цитозольних (розчинних) субодиниць  $\text{p67}^{\text{phox}}$  та  $\text{p47}^{\text{phox}}$  фосфатидилінозитол-3-кіназою (PI3-K) та протеїнкіназою С відповідно. Фосфорилування спонукає  $\text{p67}^{\text{phox}}$  та  $\text{p47}^{\text{phox}}$  до транслокації на внутрішню поверхню плазматичної мембрани. Активна форма NOX утворюється приєднанням  $\text{p67}^{\text{phox}}$  до Rac1/2, а  $\text{p47}^{\text{phox}}$  – до субодиниці  $\text{p22}^{\text{phox}}$ .

Для NOX2 нейтрофілів показано, що фосфорилування цитозольних субодиниць NOX залежить від природи агоніста. Дія одних агоністів спричинює швидко (протягом 3–5

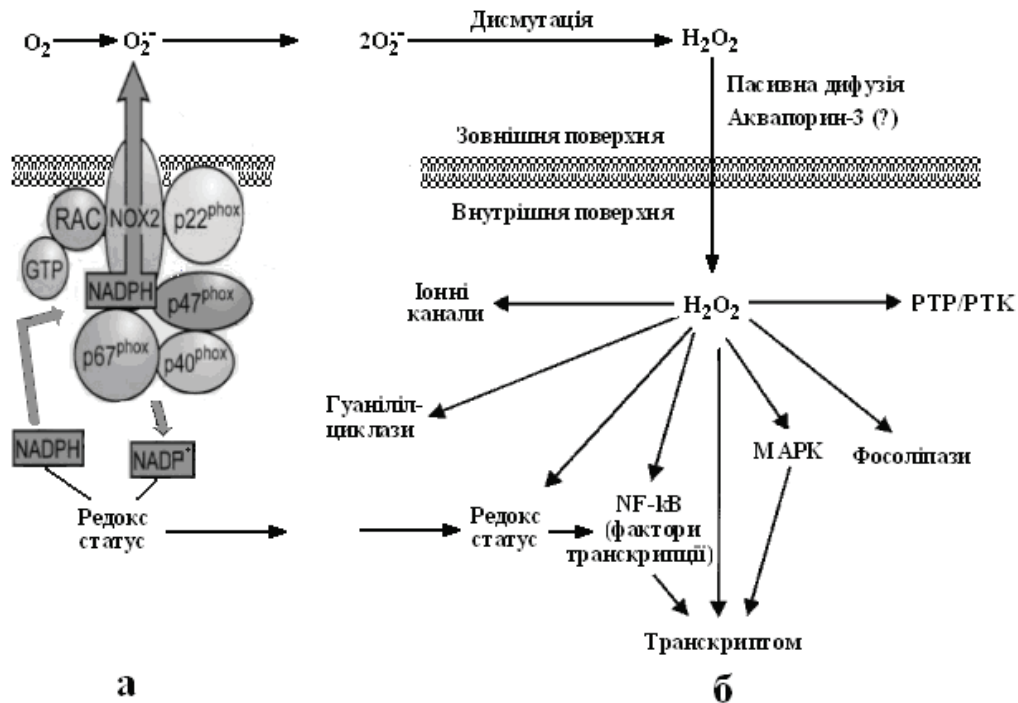


Рис. 1. NOX2-залежна вихідна (а) та вхідна (б) сигналізація тромбоцитів

хв) активацію NOX. Інші агоністи забезпечують пролонговану активацію NOX, яка розвивається протягом 15–60 хв [17]. Показано, що швидкість активації NOX пов'язана зі ступенем фосфорилування цитозольних субодиниць і вибірковістю їх залучення до асоціації на плазматичній мембрані. Зокрема, за асоціацію цитозольних субодиниць на мембарні зазвичай відповідає фосфорильована субодиниця  $p47^{\text{phox}}$ , отже, сам ступінь фосфорилування  $p47^{\text{phox}}$  корелює з ригідністю агоністів повільної дії. Натомість, активація NOX таким агоністом швидкої дії, як тромбоцитарноактиваторний фактор здійснюється за допомогою більш повного фосфорилування  $p67^{\text{phox}}$ ,  $p40^{\text{phox}}$  та Rac2 та взагалі не потребує фосфорилування та транслокації  $p47^{\text{phox}}$  [17]. Напевно, регуляція NOX2 тромбоцитів може мати свої особливості, проте наведений приклад дає змогу окреслити потенційні механізми агоністзалежної продукції АФК, зумовленої процесом вибіркового фосфорилування й транслокації цитозольних субодиниць оксидази на плазматичну мембрану.

У свою чергу тривалий контакт з низькими концентраціями  $\cdot\text{O}_2^-$  сенсibiliзує реакцію тромбоцитів на тромбін. Подібна узгодженість указує на синергію активаторної дії  $\cdot\text{O}_2^-$  та агоністів рецепторзалежної агрегації. Пронаявність описаного синергічного ефекту свідчать експериментальні дані щодо пригнічення інгібіторами PI3-кінази та протеїнкінази C продукції  $\cdot\text{O}_2^-$  з поверхні тромбоцитів, активованих тромбіном [9].

У клітині NOX-продуктовані АФК залучаються до системи сигнальної трансдукції за участі редоксчутливих посередників. Насамперед це стосується регуляції балансу тирозинових протеїнфосфатаз і протеїнкіназ, що стабілізує фосфорильований стан PI3-кінази, протеїнкінази C та інших сигнальних білків, які реципрокно підтримують активний стан NOX.

Вважають, що першою ланкою, чутливою до конформаційних змін інтегрінових рецепторів, а також рецепторів GPCR (від англ. G-protein coupled receptors), є протеїнкіназа

з родини Src [7]. Src притаманна двофазна активація: перша фаза (слабка рання активація) – редоксnezалежна, зумовлена формуванням фокального контакту з активованим рецептором; друга фаза (потужна завершена активація) потребує окиснення двох редоксчутливих залишків цистеїну та утворення дисульфідного зв'язку. Протягом першої фази з участю протеїнфосфатази дефосфорильовується залишок тирозину в С-кінцевій ділянці Src та утворюється «відкрита» конформація (рис. 2,а), що забезпечує доступ до тирозину в активному центрі та його автофосфорилування.

Як відомо, перша фаза активації тромбоцитів неспроможна самостійно підтримати адекватне збудження сигнальної мережі для формування клітинної відповіді. Воно відбувається протягом другої фази, яка збігається з етапом пізньої адгезії тромбоцитів, протягом якого підсилюється дія агоністів і суттєво збільшується продукція АФК. Саме на цьому етапі відбувається пряме окиснення Src та утворюється її максимально активна конформація завдяки формуванню S-S-зв'язку (див. рис. 2,б). За умов підсилення продукції ендогенних АФК Src кіназа може також переходити в максимально активний стан за лігандnezалежним механізмом (див. рис. 2, I та II) та конститутивно підтримувати процеси фосфорилування інших протеїнкіназ. Зокрема, кіназа Src може регулювати активність NOX через позитивну редокс-регуляцію ГТФази Rac1 (див. рис. 2,в), тим самим стабілізуючи власну гіперактивність за рахунок підвищення вмісту клітинних АФК (див. рис. 2, II).

Аутокринна NOX-залежна регуляція функціональної активності тромбоцитів. Порівнюючи активність кількох АФК-генеруючих оксидоредуктазозалежних систем тромбоцитів, короткочасно (протягом 1 хв) стимульованих тромбіном, Begonia та співавт. [5] з'ясували, що дихальний ланцюг мітохондрій, ксантин-оксидаза та NO-синтаза майже не змінюють рівень цитозольного пулу АФК, тоді як активація циклооксигенази (COX) та NOX суттєво його збільшує. COX та NOX



діють незалежно, забезпечуючи приблизно однаковий внесок у зміни кількості  $\cdot\text{O}_2^-$  в стимульованій клітині. Важливо, що тільки та частка цитозольного  $\cdot\text{O}_2^-$ , яку продукує NOX (але не COX), має проагрегаційний вплив на тромбоцити, стимульовані тромбіном. Встановлено, що активація NOX, індукована тромбіном, призводить до прямого підсилення активності інтегринового рецептора  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  та не впливає на зміни форми стимульованих клітин, на ступінь фосфорилування легкого ланцюга міозину, на активацію білка RhoA, а також майже не діє на секрецію  $\delta$ - та  $\alpha$ -гранул [5]. Короткотривалий контакт з агоністами (тромбіном, АДФ, нефізіологічними аналогами тромбоксану A2 та колагену) не підсилює АФК-продукуючу здатність тромбоцитів [5].

Більш тривала стимуляція тромбіном (протягом 15 хв) супроводжувалася нако-

пиченням АФК у позамембранному середовищі, тоді як конвулксин (аналог колагену, ліганд для рецептора GP VI) підвищував вміст цитозольних АФК. Антиоксиданти та інгібітори NOX суттєво знижували вміст тромбін-залежної продукції АФК та пригнічували секрецію з  $\alpha$ -гранул [3], що свідчить про залучення NOX до регуляції секреторної функції тромбоцитів.

NOX також здатна підсилювати агрегацію та секрецію, ініційовані стимульованим рецептором GP VI, бо NOX-продукований  $\cdot\text{O}_2^-$  підвищує афінність рецептора до колагену [2].

Як відомо, агрегація тромбоцитів, активованих слабкими агоністами, стримується протилежно спрямованим механізмом дезагрегації, який зумовлено насамперед інгібіторною дією ендogenous NO. Останній

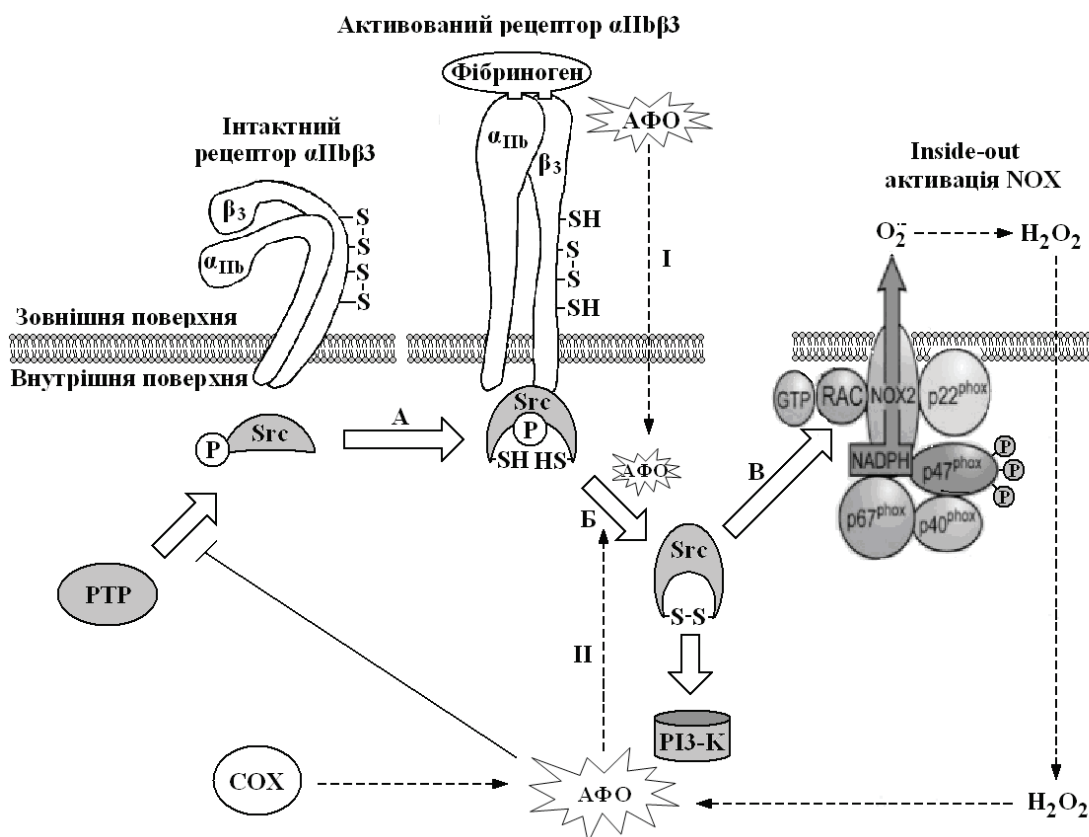


Рис.2. Уявна схема NOX-залежної сигналізації тромбоцитів на етапі розпізнавання зовнішнього сигналу (ліганд – фібриноген, рецептор – інтегрин  $\alpha_{IIIb}\beta_3$ ). Пояснення у тексті.

накопичується в цитозолі внаслідок активності NO-синтази (NOS) та впливає на агрегацію через сигнальну систему цГМФ/РКГ. Встановлено, що цГМФ/РКГ-шлях здійснює бімодальний вплив на процес активації тромбоцитів: через вихідну активацію рецепторів адгезії низькими концентраціями та їх пригнічення високими концентраціями протеїнкінази G (РКГ) [23]. Зростання вмісту  $\cdot\text{O}_2^-$  у тромбоцитах сприяє процесу адгезії та агрегації, відмінюючи дію NO. До того ж, пероксинітрит, продукт дисмутації  $\cdot\text{O}_2^-$  та NO, є набагато потужнішим прооксидантом, ніж власне  $\cdot\text{O}_2^-$ , він здатний підсилювати продукцію АФК вже агрегованими тромбоцитами.

Вирішальну роль у регуляції агрегації–деагрегації відіграє РІЗ-кіназа, активність якої контролює протеїнкіназа C [9]. РІЗ-кіназа через downstream-регуляцію підтримує баланс активностей NOX та NOS. У цьому тандемі NOX виступає активатором процесів агрегації/секреції тромбоцитів, NOS – інгібітора цих подій. NOS-залежна протидія агрегації обмежується тим суттєвіше, чим вищою є активність NOX та чим значніше проявляється нейтралізуючий вплив  $\cdot\text{O}_2^-$  на NO [15]. Крім того, за певних патологічних умов (низький вміст субстрату L-аргініну) NOS може перемикається на продукцію  $\cdot\text{O}_2^-$  замість NO. Підсилення продукції АФК та АФА ампліфікує реакції послідовного фосфорилування низки сигнальних білків, задіяних у вихідній регуляції інтегрину  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ . Останній є рецептором, який відіграє провідну роль у процесах адгезії та агрегації як головний первинний медіатор контактзалежної сигналізації тромбоцитів. Активація тромбоцитів таким потужним агоністом, як тромбін, вмикає фосфоінозитидзалежний метаболічний каскад, що забезпечує агоністзалежну стабілізацію активної форми  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ . З цього моменту агрегація стає незворотною.

NOX-залежна продукція АФК може пригнічувати активність цитозольних фосфатаз і стабілізувати фосфорильований стан низки цитоскелетних білків, таких, як талін. Талін,

активованій фосфорилуванням, приєднується до цитоплазматичного домену  $\beta_3$  та спричинює конформаційні зміни в структурі інтегринового рецептора  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ . Наслідком цих конфірмаційних перебудов є роз'єднання цитоплазматичних «хвостів» трансмембранних доменів  $\alpha_{\text{IIb}}$  і  $\beta_3$  та олігомеризація ектодоменів, які, з'єднуючись, формують сайт зв'язування для фібриногену (див. рис. 2) [38]. Активація  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  компетентними лігандами призводить спочатку до змін конформації рецепторів (афінна модуляція), а потім (не завжди) до їхньої кластеризації (авідна модуляція) [34]. Набута структурна перебудова рецептора надає йому властивості сигнальної молекули, бо приєднання ліганду ініціює низку реакцій фосфорилування, починаючи з залишків тирозину у короткому внутрішньоклітинному хвості  $\beta_3$ -інтегрину – складової частини лігандзв'язувальної ділянки.

Доведено, що етап формування вхідного сигналу від рецептора  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  є редоксчутливим, бо підвищення вмісту АФК полегшує активацію (передактивацію) рецептора. Показано, що  $\text{H}_2\text{O}_2$  (400–900 мкмоль/л) підсилює фосфорилування тирозину субодиниці  $\beta_3$  за допомогою пригнічення активності протеїнфосфатази [14], та перебудови тіолдисульфідних внутрішньомолекулярних зв'язків.

Отже, афінна модуляція є тригером вхідних сигналів, які швидко розповсюджуються та розгалужуються протягом зворотної фази агрегації. Під контролем цих сигналів зокрема знаходяться процеси білкового синтезу та дегрануляції (секреції) тромбоцитів.

Вважають, що виконавчими елементами механізму активації NOX можуть бути як ферментативні так і неферментативні антиоксиданти. Зокрема, тромбоцити експресують антиоксидантні ферменти не лише для захисту в умовах оксидативного стресу, але й для їхнього залучення до аутокринної редокс-регуляції. Одним із таких ферментів-антиоксидантів є глутатіон-пероксидаза (GPx). Використовуючи глутатіон (GSH) як косубстрат, GPx відновлює  $\text{H}_2\text{O}_2$  до води

та підвищує рівень окисненого глутатіону (GSSG) [12]. За певних умов у тромбоцитах утворюється  $\cdot\text{O}_2^-$  NOX- чи COX-залежним шляхом. Цитозольний  $\cdot\text{O}_2^-$  може безпосередньо взаємодіяти з GSH і, в ході ланцюгової реакції, утворювати GSSG та додатковий  $\cdot\text{O}_2^-$  [36, 37]. Таким чином,  $\cdot\text{O}_2^-$  та GPx здатні знижувати GSH/GSSG-рівновагу, яка є визначальною для редокс-регуляції функціональних білків. Збереження редокс-гомеостазу клітини забезпечується ферментом глутатіонредуктазою через реакцію відновлення GSSG до GSH. Відновлення GSH потребує витрачання цитозольного NADPH. Регулюючи вміст NADPH та NADPH-опосередкований рівень тіювання сигнальних білків, NOX може контролювати процеси трансляції та посттрансляційної модифікації білків у тромбоцитах. За нормальних умов у клітинному середовищі GSH/GSSG є високим ( $\sim 100/1$ ), тому сульфгідрильні групи білків знаходяться у відновленій формі (-SH) [11]. Показано, що зміна редокс-балансу в бік зниження внутрішньоклітинного вмісту GSH/GSSG підвищує чутливість тромбоцитів до активуючих агентів [35]. Напевно, протидія антиоксидантів, спрямована на нейтралізацію АФК у клітинному просторі, забезпечує NO-незалежний шлях регуляції активності NOX [10, 12].

Паракринна регуляція та рекрутування тромбоцитів. Збільшується число експериментальних фактів, які свідчать про значне підвищення вмісту АФК у позаклітинному просторі після стимуляції тромбоцитів колагеном чи тромбіном. Подібний ефект спричиняють також певні медіатори активації клітин крові та судинної стінки. Зокрема, медіатор запалення фактор некрозу пухлин- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) стимулює продукцію АФК тромбоцитами. Гіпертонія також супроводжується посиленням утворення тромбоцитарних АФК [10].

Доведено, що витік  $\cdot\text{O}_2^-$  та  $\text{H}_2\text{O}_2$  з поверхні тромбоцитів під впливом агоністів вимірюється наномольними кількостями та зумовлений активністю NOX [1, 21]. Показано, що

короткотривала (1 хв) дія таких агоністів, як тромбін, конвулксин, синтетичний аналог  $\text{TXA}_2$  та АДФ не супроводжувалась продукуванням АФК у позаклітинний простір [6]. Лише колагенстимульовані тромбоцити підсилюють здатність NOX утворювати  $\cdot\text{O}_2^-$  на зовнішній поверхні плазматичної мембрани. Не впливаючи на колагенові рецептори,  $\cdot\text{O}_2^-$  сприяє підвищенню позаклітинного вмісту та посиленню аутокринної дії АДФ. Цей агоніст у низькій концентрації (1 мкмоль/л) здатен індукувати не лише зворотну агрегацію тромбоцитів, наявність  $\cdot\text{O}_2^-$  забезпечує повну незворотну агрегацію тією самою кількістю АДФ [21].

Більш тривалі експозиції із застосуванням синтетичних стимуляторів (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) або кальцієвий іонофор A23187) дозволили виявити достовірне підвищення вмісту  $\cdot\text{O}_2^-$  на 20-й та 30-й хвилини від початку впливу, який протягом години зростає в 2 і 3 рази відповідно для TPA і A23187 [32]. Порівняння у часі кінетики агрегації та генерації агоністіндукованих АФК довело, що вони вивільнюються наприкінці агрегації.

Цікаво, що тромбоцити, стимульовані колагеном, починають агрегувати через 1–2 хв після контакту з агоністом, а початок активації NOX припадає на третю–п'яту хвилину. Отже, роль NOX в ініціації агрегації має бути мінімальною, втім її внесок зростає на останніх етапах тромбоутворення, де NOX забезпечує незворотну агрегацію та стабілізацію тромбів. Вочевидь, виділені під час агрегації вільнорадикальні сполуки впливають більшою мірою на незадіяні тромбоцити. Які наближаються до місця утворення тромбу. Це явище відомо як «рекрутування» тромбоцитів [21].

Відтерміноване у часі зростання вмісту АФК, які генерує NOX у плазму крові, напевно, має вирішальне значення саме для паракринної регуляції агрегації. Слід зауважити, що агрегація тромбоцитів *in vitro* є процесом, що відбувається за принципом

«все або нічого», в якому всі тромбоцити дають відповідь одночасно. Це підтверджує, що речовини, секретовані вже під час агрегації, слабо впливатимуть на популяцію тромбоцитів, яка їх продукує, тобто втрачають функцію аутокринних регуляторів.

Підсумовуючи, варто зазначити, що сукупність встановлених на сьогодні експериментальних фактів указує на можливе існування ще однієї, досі невисвітленої функції NOX. Очевидно, що кількість  $\text{O}_2^-$  продукованого NOX в позаклітинний простір стехіометрично пов'язана з концентрацією відновлених еквівалентів у клітині (NADH та NADPH). Отже, субстратзалежні зміни активності NOX і, відповідно, позаклітинного вмісту  $\text{O}_2^-$ , можуть бути способом передачі вихідної інформації про редокс-стан клітини. Сума редокс-сигналів окремих клітин, змінюючи загальний окисно-відновний фон позаклітинного середовища, створює своєрідний міжклітинний комунікаційний простір. Таким чином, можна очікувати, що вміст  $\text{O}_2^-$  та  $\text{H}_2\text{O}_2$ , транслокованих назад у клітину, буде нести інформацію про редокс-стан мікросередовища та розташованих поряд клітин. На нашу думку, цей гіпотетичний механізм має бути винятково важливим для забезпечення паракринного комунікативного зв'язку між сусідніми клітинами та для узгодженої одночасної відповіді субпопуляції тромбоцитів на тромбогенний стимул. До подібного способу комунікації, імовірно можуть залучатись інші клітини крові та судинної стінки. Треба відмітити, що перші спроби розглянути організацію «оркестру» міжклітинних взаємодій з урахуванням редокс-системи плазматичних мембран та залученням редокскомпетентних гуморальних факторів вже з'являються в сучасній науковій літературі [18, 30].

На жаль, незважаючи на значні досягнення в пошуках ефективних регуляторних мішеней для терапевтичного втручання в процес тромбогенезу, нині ця проблема залишається відкритою. Новітні уявлення про спектр властивостей NOX та особливості її регуляції на

плазматичній мембрані тромбоцитів мають стати підґрунтям для принципово інших терапевтичних підходів, заснованих на контролі активності цього ферменту та її корекції. Можливо, застосування цих підходів дасть змогу реабілітувати антиоксидантну терапію, з якою було пов'язано багато сподівань, не реалізованих і до цього часу.

**С.А. Таланов, Т.І. Ляшенко, И.И. Паталах**

## **РОЛЬ NADPH-ОКСИДАЗЫ В ПАРАКРИННОЙ И АУТОКРИННОЙ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ**

NADPH-оксидаза (NOX) – трансмембранный фермент, недавно обнаруженный в тромбоцитах, рассматривается в контексте ее ведущего значения для регуляции клеточных сигнальных систем. Активность NOX тромбоцитов контролируется агонистами активации рецепторов, действие которых в свою очередь подвергается модулирующему влиянию NOX. В данном обзоре внимание сосредоточено на оценке участия NOX в аутокринной и паракринной регуляции процессов активации, агрегации, секреции, синтеза белков и рекрутирования тромбоцитов при формировании тромба. Обсуждается возможность участия NOX в формировании коммуникативной связи между соседними клетками, а также в координации ответа субпопуляции тромбоцитов на тромбогенный стимул.

Ключевые слова: тромбоциты, NADPH-оксидаза, рецепторы, редокс-сигналинг.

**S.A. Talanov, T.I. Lyashenko, I.I. Patalakh**

## **THE ROLE OF NADPH-OXIDASE IN PARACRINE AND AUTOCRINE REGULATION OF PLATELET FUNCTIONAL ACTIVITY**

NADPH-oxidase (NOX) is a novel transmembrane enzyme that appears to have pivotal role in the control of platelet signal pathways. The NOX activity in platelets is controlled by agonist receptors activation, which, in turn are modulated by NOX. This review focuses on participation of NOX in autocrine and paracrine regulation of platelet activation, aggregation secretion, protein synthesis and cell recruitment processes during thrombus formation. Possible involving of NOX in the cell-to-cell communication and coordination in response to thrombogenic stimulus is discussed.

Key words: platelet, NADPH-oxidase, reactive oxygen species, ROS-signaling.

*Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;*

*Київ. міськ. центр крові;*

*Ін-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ*



# СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ardanaz N., Pagano P.J. Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: regulation and signaling leading to dysfunction // *Exp. Biol. Med.* – 2006. – **231**, № 3. – P.237–251.
2. Arthur J.F., Gardiner E.E., Kenny D. Platelet receptor redox regulation // *Platelets.* – 2008. – **19**, № 1. – P. 1–8.
3. Bakdash N., Williams M.S. Spatially distinct production of reactive oxygen species regulates platelet activation // *Free Radic. Biol. Med.* – 2008. – **45**, № 2. – P. 158–166.
4. Bedard K., Krause K.-H. The NOX-family of ROS-generating NADPH oxidase: physiology and pathophysiology // *Physiol. Rev.* – 2007. – **87**, № 1. – P. 245–313.
5. Begonja A.J., Gambaryan S., Geiger J. Platelet NAD(P)H-oxidase generated ROS production regulates  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-integrin activation independent of the NO/cGMP pathway // *Blood.* – 2005. – **106**, № 8. – P. 2757–2760.
6. Begonja A.J., Teichmann L., Geiger J. Platelet regulation by NO/cGMP signaling and NAD(P)H oxidase-generated ROS // *Blood Cells, Mol. Dis.* – 2006. – **36**, № 2. – P. 166–170.
7. Chiarugi P. Src redox regulation: there is more than meets the eye // *Mol. Cells.* – 2008. – **26**, № 4. – P. 329–337.
8. Chlopicki S., Olszanecki R., Janiszewski M. Functional role of NADPH oxidase in activation of platelets // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2004. – **6**, № 4. – P. 691–698.
9. Clutton P., Miermont A., Freedman J.E. Regulation of endogenous reactive oxygen species in platelets can reverse aggregation // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2004. – **24**, № 1. – P. 187–192.
10. Essex D.W. Redox Control of Platelet Function // *Antioxid. Redox Signal.* – 2009. – **11**, № 5. – P. 1191–1225.
11. Essex D.W., Li M., Feinman R.D., Miller A. Platelet surface glutathione reductase-like activity // *Blood.* – 2004. – **104**, № 5. – P. 1383–1385.
12. Freedman J.E. Oxidative stress and platelets // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2008. – **28**. – P. 11–16.
13. Groemping Y., Lapouge K., Smerdon S.J., Rittinger K. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of NADPH oxidase // *Cell.* – 2003. – **113**, № 3. – P. 343–355.
14. Irani K., Pham Y., Coleman L.D. et al. Priming of platelet  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 by oxidants is associated with tyrosine phosphorylation of  $\beta$ 3 // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1998. – **18**, № 11. – P. 1698–1706.
15. Iuliano L., Colavita A.R., Leo R., Violi F. Oxygen free radicals and platelet activation // *Free Radic. Biol. Med.* – 1997. – **22**, № 6. – P. 999–1006.
16. Jiang F., Zhang Y., Dusting G. J. NADPH Oxidase-Mediated Redox Signaling: Roles in Cellular Stress Response, Stress Tolerance, and Tissue Repair // *Pharmacol. Rev.* – 2011. – **63**, № 1. – P. 218–242.
17. Jin S., Zhou F., Katirai F., Li P.-L. Lipid Raft Redox Signaling: Molecular Mechanisms in Health and Disease // *Antioxid. Redox Signal.* – 2011. – **15**, № 4. – P. 1043–1083.
18. Jones D.P. Radical-free biology of oxidative stress // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2008. – **295**, № 4. – P. C849–C868.
19. Kamata H., Hirata H. Redox regulation of cellular signaling // *Cell. Signal.* – 1999. – **11**, № 1. – P. 1–14.
20. Krötz F., Sohn H., Pohl U. Reactive oxygen species: players in platelets game // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2004. – **24**, № 11. – P. 1988–1996.
21. Krötz F., Sohn H.Y., Gloe T. NAD(P)H-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment // *Blood.* – 2002. – **100**, № 3. – P. 917–924.
22. Li Z., Delaney M.K., O'Brien K.A., Du X. Signaling during platelet adhesion and activation // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2010. – **30**, № 12. – P. 2341–2349.
23. Li Z., Zhang G., Marjanovic J.A. A platelet secretion pathway mediated by cGMP-dependent protein kinase // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**, № 41. – P. 42469–42475.
24. Lindemann S, Gawaz M. The active platelet: translation and protein synthesis in an anucleate cell // *Semin. Thromb. Hemost.* – 2007. – **33**, № 2. – P.144–150.
25. Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N. et al. ROS signaling: the new wave? // *Trends Plant Sci.* – 2011. – **16**, № 6. – P. 300–309.
26. Nardi M., Feinmark S.J., Hu L. Complement-independent Ab-induced peroxide lysis of platelets requires 12-IPloxygenase and a platelet NADPH oxidase pathway // *J. Clin. Invest.* – 2004. – **113**, № 7. – P. 973–980.
27. Naseem K.M, Bruckdorfer K.R. Hydrogen peroxide at low concentrations strongly enhances the inhibitory effect of nitric oxide on platelets // *Biochem. J.* – 1995. – **310** (Pt 1). – P. 149–153.
28. Piersma S.R., Broxterman H.J., Kapci M. Proteomics of the TRAP-induced platelet releasate // *J. Proteomics.* – 2009. – **72**, № 1. – P. 91–109.
29. Pignatelli P., Sanguigni V., Lenti L. gp91phox-dependent expression of platelet CD40 ligand // *Circulation.* – 2004. – **110**, № 10. – P. 1326–1329.
30. Principe D.D., Frega G., Savini I. The plasma membrane redox system in human platelet functions and platelet-leukocyte interactions // *Thromb. Haemost.* – 2009. – **101**, № 2. – P. 284–289.
31. Salvemini D., Radziszewski W., Mollace V. Diphenylene iodonium, an inhibitor of free radical formation, inhibits platelet aggregation // *Eur. J. Pharmacol.* – 1991. – **199**, № 1. – P. 15–18.
32. Seno T., Inoue N., Gao D. Involvement of NADH/NADPH oxidase in human platelet ROS production // *Thromb. Res.* – 2001. – **103**, № 5. – P. 399–409.
33. Stef G., Csiszar A., Xiangmin Z. Inhibition of NAD(P)H oxidase attenuates aggregation of platelets from high-risk cardiac patients with aspirin resistance // *Pharmacol. Rep.* – 2007. – **59**, № 4. – P. 428–436.
34. Stouffer G.A. and Smyth S.S. Effects of thrombin on interactions between  $\beta$ 3-integrins and extracellular matrix in platelets and vascular cells // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2003. – **23**, № 11. – P. 1971–1978.
35. Van Gorp R.M., Dam-Mieras M.C., Hornstra G., Heemskerk J.W. Effect of membrane-permeable sul-



- thiyl reagents and depletion of glutathione on calcium mobilisation in human platelets // Biochem. Pharmacol. – 1997. – 53, № 10. – P. 1533–1542.
36. Winterbourn C.C., Metodiewa D. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide // Free Radic. Biol. Med. – 1999. – 27, № 3-4. – P. 322–328.
37. Winterbourn C.C., Metodiewa D. The reaction of superoxide with reduced glutathione // Arch. Biochem. Biophys. – 1994. – 314, № 2. – P. 284–290.
38. Zou Z., Chen H., Schmaier A.A. Structure-function analysis reveals discrete beta3 integrin inside-out and outside-in signaling pathways in platelets // Blood. – 2007. – 109, № 8. – P. 3284–3290.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;  
Київ. міськ. центр крові;  
Ин-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ  
E-mail: [ipatalakh@ukr.net](mailto:ipatalakh@ukr.net)*

*Матеріал надійшов до  
редакції 09.10.2012*

# ПАМ'ЯТНІ ДАТИ

І.А. Владимирова, І.Б. Філіппов

## Внесок академіка М.Ф. Шуби в розуміння механізмів синаптичної передачі в гладеньких м'язах

30 жовтня 2013 р. виповнилося б 85-років з дня народження всесвітньо відомого українського вченого, академіка НАН України, завідувача відділу нервово-м'язової фізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, двічі лауреата Державної премії України Михайла Федоровича Шуби. Вся наукова діяльність М.Ф. Шуби була присвячена дослідженню механізмів функціонування гладеньких м'язів на клітинному та молекулярному рівнях – напрямку, який зародився в середині 50-х років минулого сторіччя і завдячує своєму становленню і сучасному рівню розвитку таким корифеям фізіологічної науки, як Едіт Бюлбрінг, Тадао Томіта, Хіроші Куріяма, Джефрі Бернсток, Молі Холман, Чен Као, Ендрю Сомліо, Рік Кастіліз та інші. Поряд з цими іменами по-праву стоїть ім'я Михайла Шуби.

### Як усе розпочиналось

Свої дослідження в галузі фізіології гладеньких м'язів М.Ф. Шуба розпочав зразу після захисту кандидатської дисертації у 1958 р. працюючи у відділі електрофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця АН УРСР (тепер НАН України) під керівництвом видатного електрофізіолога, вченого і прекрасної людини, Данила Семеновича Воронцова. Досвід і далекоглядність сивочолого академіка помножені на вміння, працелюбність і ентузіазм молодого кандидата наук дали змогу фактично з нуля підняти новий напрямок досліджень в Інституті – фізіологію гладень-

ких м'язів. Завдяки зусиллям М.Ф. Шуби і його невеликої групи ці дослідження просувалися настільки успішно, що постало питання про створення в Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця спеціалізованого відділу, роботи якого цілком були б зосереджені на з'ясуванні механізмів збудження–скорочення гладеньких м'язів і нервово-м'язової передачі. У 1969 р. такий відділ під керівництвом уже на той час молодого доктора наук М.Ф. Шуби було створено. Цей відділ став унікальним осередком з вивчення гладеньких м'язів на теренах колишнього СРСР, а дослідження, які в ньому проводилися, досягли такого рівня, що почали визначати напрямок розвитку цього розділу фізіології у світі.

У своїх ранніх працях (1958–1961) М.Ф. Шуба вперше описав явище “фізичного електротону” в гладеньких м'язах і на цій основі запропонував теорію кабельної будови гладеньких м'язів. Це відкриття дало змогу розробити принципово нову концепцію розповсюдження електричних сигналів у гладком'язовій тканині як у свого роду “електричному синцитію”, в якому окремі гладком'язві клітини (ГМК) з'єднані між собою за допомогою електропровідних низькоомних контактів [7]. Такий принциповий прорив у розумінні електрозбудливості гладком'язової тканини став можливим завдяки використанню передових методичних підходів електрофізіологічного дослідження, зокрема, метода сахарозного містка, який у відділі постійно удосконалювався для отримання

© І.А. Владимирова, І.Б. Філіппов

мання все більш якісних відведень електричних сигналів [1].

Апамін – ключ для розуміння медіаторної природи нервової регуляції гладеньких м'язів

Знання про механізми нервового контролю скорочення гладеньких м'язів є надзвичайно важливими для розуміння регуляції рухової активності гладеньких м'язів внутрішніх органів. Тому не випадково, що Михайло Федорович приділяв велике значення вивченню нервово-м'язової передачі в гладеньких м'язах.

Поодинокі електричні подразнення нервових утворень, що знаходяться у товщі гладеньких м'язів стінки шлунково-кишкового тракту (ШКТ), завжди супроводжується виникненням збуджувальних, або гальмівних синаптичних потенціалів (ЗСП або ГСП). Відомо, що збуджувальні синаптичні потенціали вісцеральних м'язів холінергічної природи, в той час як гальмівні – нехолінергічної та неадренергічної природи. Синаптичні потенціали, які генеруються в присутності холіно- і адреноблокаторів, і медіаторна природа яких залишалася довгий час невідомою, отримали назву неадренергічних і нехолінергічних (НАНХ). І тільки у 1978 р., через 15 років після відкриття НАНХ гальмування, нам уперше вдалося ефективно і зворотньо заблокувати ГСП в гладеньких м'язах шлунково-кишкового тракту за допомогою апаміна – поліпептида із бджолої отрути [3]. Подальші дослідження показали, що апамін вибірково блокує синаптичну передачу та гіперполяризувальну дію екзогенної АТФ і норадреналіну в інтестинальних гладеньких м'язах (рис. 1) [2, 3, 4, 28, 29]. За ініціативою тодішнього директора нашого Інституту, вельми освіченого і далекоглядного вченого, академіка П.Г.Костюка нами використався апамін, який був синтезований і наданий Інституту докт. хім. наук А.І. Мірошниковим з Інституту біоорганічної хімії АН СРСР (Москва), що свідчить про плідне наукове співробітництво двох Інститутів колишнього Союзу.

Завдяки апаміну було виявлено не тільки блокування синаптичної та АТФ-викликаної гіперполяризації мембрани ГМК, а і вперше показано існування нехолінергічних ЗСП та деполаризуючої дії АТФ.

У зв'язку з тим, що апамін переважно блокував тільки першу, швидку фазу ГСП гладеньких м'язів усіх відділів кишечника (див. рис. 1,а), можна було припустити, що перша фаза ГСП зумовлена безпосередньою дією АТФ як нейропередатчика, вивільненого з нервових закінчень, тоді як друга – дією аденозина, що виникає в результаті розщеплення АТФ. Хоч припущення про роль аденозину згодом не підтвердилось, але воно дало поштовх нашим подальшим пошукам.

Слід зазначити, що дослідження медіаторної та іонної природи двох компонентів ГСП у гладеньких м'язах ШКТ були нами проведені у співробітництві з проф. Джефрі Бернстоком в Університетському коледжі Лондона. Дж. Бернсток є прикладом унікального вченого, який не тільки вперше відкрив ефективне НАНХ-гальмування інтестинальних гладеньких м'язів і висунув теорію його пуринергічної природи [21], а і фактично став засновником сучасної концепції пуринергічної сигналізації. Він запропонував класифікацію пуринорецепторів, об'єднавши рецептори АТФ в так званий Р2-тип, який у свою чергу розпадається на два підтипи – Р2Х, що являють собою АТФ-керований іонний канал, та Р2У, які впливають на свої ефектори через G-білки [17, 22].

Саме завдяки нашому співробітництву з Дж. Бернстоком було показано, що друга фаза синаптичного гальмування не пов'язана з активацією аденозинових пуринорецепторів Р1-типу на постсинаптичній мембрані ГМК, а має іншу медіаторну природу [25].

Детальне дослідження впливу інтрамуральних нервових волокон різних відділів ШКТ тварин і людини дали змогу виявити як загальні властивості, так і деякі видові особливості цієї синаптичної передачі. Михайло Федорович особливу увагу звертав на

дослідження медіаторних й іонних механізмів синаптичних потенціалів в ГМК. Для цього було застосовано фармакологічний підход, використовуючи комбінації різних блокаторів іонних каналів і рецепторів. Так, блокатор АТФ-рецепторів, сурамін, пригнічував швидкий компонент ГСП, не впливаючи на повільний [31]. Разом з даними з блокування швидкого компонента ГСП (як і АТФ-викликаної гіперполяризації) апаміном (рис. 2) це загалом підтверджувало його пуринергічну природу. Водночас чутливість другого компонента ГСП до тетраетиламонію та блокатора синтезу оксиду азоту (NO) NO-синтазою – L-NAME давала підстави вважати, що він має NO-ергічну природу [33, 35].

Дослідження фармакологічних дій апаміну показали, що він є ефективним і селективним блокатором кальційзалежних калієвих каналів малої провідності [18]. Цей факт дав нам можливість зробити висновок, що в генерації першого, швидкого АТФ-залежного компонента ГСП залучені кальційзалежні калієві канали малої провідності. Щодо другого, повільного, NO-ергічного компонента ГСП, то ще у наших спільних експериментах з Дж. Бернстоком було показано, що цей, апаміннечутливий компонент ГПП може бути пригнічений малими концентраціями класичного калієвого блокатора тетраетиламонію (ТЕА, 2–5 ммоль/л), що свідчить про участь у його генерації інших калієвих каналів – найімовірніше кальційзалежних калієвих каналів великої провідності [4]. Прямую підтримку наявності двох типів кальційзалежних калієвих каналів (малої та великої провідності) у мембрані ГМК було отримано і в експериментах на ізольованих клітинах із застосуванням методу фіксації потенціалу [27]. Слід зазначити, що відсутність нехолінергічних ЗСП у ГМК дистального відділу товстої кишки морської свинки за наявності апаміну навряд чи можна було пояснити великими калієвими струмами тому, що за звичайних умов ці м'язи генерують спонтанні потенціали дії.

## **Внутрішньоклітинні сигнальні механізми регуляції гладеньких м'язів**

Одним з перспективних напрямків роботи відділу, розробку якого Михайло Федорович доручив співробітнику відділу канд. біол. наук Філіппову І.Б., було дослідження залучення внутрішньоклітинних шляхів у процесі генерації синаптичних потенціалів та дію нейромедіаторів. У зв'язку з тим, що гальмівна дія АТФ на гладенькі м'язи кишечника здійснюється через метаболічні Р2У-рецептори, які спряжені з фосфоліпазою С (PLC) [26] з наступною мобілізацією кальцію, для встановлення її ролі і пов'язаних з нею внутрішньоклітинних сигнальних посередників у механізмах генерації ГСП, використовували фармакологічне пригнічення функції PLC за допомогою U73122. Було показано (рис. 3), що U73122 зменшує амплітуду гальмівних синаптичних потенціалів ГМК незалежно від відділу кишечника. Водночас U73122 майже не змінював амплітуду нехолінергічних ЗСП і NO-ергічного компонента ГСП, вказуючи на те, що функціонування PLC необхідне саме для генерації пуринергічного компонента гальмівних синаптичних потенціалів [15].

Таким чином, було виявлено два можливих сигнальних механізми генерації ГСП та АТФ-індукованої гіперполяризації через Р2У-пуринорецептори: перший, через стимуляцію PLC, вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з інозитолтрифосфат( $\text{IP}_3$ )-чутливого внутрішньоклітинного кальцієвого депо та активації апамінчутливих кальційзалежних калієвих каналів малої провідності, а другий – з залученням NO та вивільненням  $\text{Ca}^{2+}$  з ріанодинчутливого внутрішньоклітинного кальцієвого депо, що призводить до активації кальційзалежних калієвих каналів великої провідності [30].

Багатогранність таланту Михайла Федоровича в організації наукових досліджень проявлялась у тому, що при виявленні якогось явища ним зразу ставилися завдання його подальшого поглибленого дослідження на різних рівнях з використанням найрізноманітніших методичних підходів. Так, якщо

була, наприклад, показана участь вторинних посередників у пуринергічному гальмуванні, то його одразу цікавило, а які ж механізми такого залучення? При цьому підключався весь методичний арсенал: від тензометрії на багатоклітинних препаратах, до електрофізіології й кальційметрії на ізольованих клітинах з залученням широкого спектра фармакологічних засобів. Цей підхід дав змогу показати, що за умов преактивації мускаринових М-холінорецепторів мембрани ГМК карбахоліном, АТФ-викликане розслаблення вісцеральних гладеньких м'язів перестає залежати від PLC. Однак, незважаючи на набуту PLC-незалежність АТФ-викликане розслаблення карбахолінового скорочення продовжувало здійснюватися через активацію  $IP_3$ -чутливих рецепторів. Про це свідчило повне пригнічення гальмівної дії АТФ на тлі карбахоліндукованого скорочення після преінкубації гладеньких м'язів у 100 мкмоль блокатора  $IP_3$ -рецепторів 2-аминоэтоксидифенил борату (2-APB).

Селективне блокування або  $M_2$ -, або  $M_3$ -холінорецепторів супроводжується повною втратою здатності згаданого блокатора  $IP_3$ -рецепторів (2-APB) пригнічувати АТФ-індуковане розслаблення гладеньких м'язів, що знаходяться в стані карбахоліндукованого скорочення. Можна припустити, що в умовах селективної преактивації  $M_2$ - або  $M_3$ -холінорецепторів механізми внутрішньоклітинної сигналізації, опосередковуючі гальмування, змінюються. За цих умов гальмівна дія нейротрансмітерів здійснюється через  $IP_3$ -незалежний шлях, тобто, шлях що зумовлює і адренергічне, і пуринергічне гальмування гладеньких м'язів виключається.

Таким чином, у проведених дослідженнях уперше було виявлено відмінності між клітинними механізмами гальмування гладеньких м'язів, викликаного дією екзогенної АТФ в умовах селективної активації або  $M_2$ -, або  $M_3$ -холінорецепторів, і механізмами розслаблювальної дії гальмівних нейропередавачів за умов сумісної синергичної активації

мускаринових холінорецепторів обох згаданих підтипів [6].

Так, проведені дослідження вперше показали відмінності у механізмах АТФ-індукованого гальмування вісцеральних гладеньких м'язів за умов фізіологічної норми та на тлі збільшеного холінергічного збудження за патологічних умов. Це відкриття свідчить про пластичність механізмів внутрішньоклітинної сигналізації, спряжених з тим чи іншим мембранним рецептором, в залежності від того чи цей рецептор активований ізольовано, чи одночасно з іншими типами рецепторів.

Відомо, що контроль функціонування нервових і м'язових клітин через деякі типи поверхневих рецепторів здійснюється також завдяки їх спряженню з внутрішньоклітинною аденілатциклазною сигнальною системою. Показано, наприклад, що клоновані  $P2Y_{11}$ -пуринорецептори за посередництвом різних G-білків ( $G_{q/11}$ , або  $G_s$ ) можуть бути двояко сполучені як з PLC, так і з аденілатциклазою (AC), яка синтезує цАМФ [19]. Зважаючи на виявлену нами складну медіаторну природу неадренергічних ГСП, ми припустили, що PLC-незалежний пуринергічний компонент, можливо, зумовлений цАМФ-опосередкованими механізмами. Дослідження, спрямовані на перевірку цього припущення, показали, що активація AC за допомогою форсколіну не впливає на генерацію ГСП атропінізованих м'язів товстої кишки морської свинки, однак в неатропінізованих гладеньких м'язах форсколін пригнічував ГСП до такого ступеня, що у відповідь на інтрамуральне подразнення вони замість ГСП генерували М-холінергічні ЗСП. Відмінності між дією форсколіну на ГСП в атропінізованих і неатропінізованих м'язах свідчать про наявність в умовах одночасної активації М-холінорецепторів і  $P2Y$ -пуринорецепторів взаємодії їх внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, що виявляється при активації AC [14]. Отже, у пуринергічне гальмування гладеньких м'язів ШКТ виявляються злученими два мембранних фермента – PLC та



АС, внаслідок взаємодії яких запускаються множинні внутрішньоклітинні сигнальні шляхи. На міру участі цих ферментів може впливати вихідний функціональний стан інтестинальних гладеньких м'язів. Ці зміни завжди спрямовані на підтримання нормального функціонування органів травного тракту [15].

У 80-ті роки минулого сторіччя Михайлом Федоровичом були ініційовані дослідження, спрямовані на з'ясування особливостей перебігу синаптичних процесів у гладеньких м'язах кишечника людини. Їх результатом цих досліджень було доведення нехолінергічної, неадренергічної природи синаптичного гальмування у кільцевих та повздожних м'язах тонкої та товстої кишки людини, отримання доказів на користь медіаторної ролі АТФ у гальмівних процесах, встановлення кальцій-залежної калієвої природи гальмівних синаптичних потенціалів і виявлення особливостей генерації ГСП при окремих патологічних змінах в кишечнику, зокрема, при хворобі Гіршспрунга [9, 34]. Учні та послідовники Михайла Федоровича, зокрема докт. біол. наук О.В. Романенко та канд. біол. наук М.М. Груша, підтримали естафету клінічно-орієнтованих досліджень і успішно продовжують їх розвивати на кафедрі біології Київського медичного інституту [8, 10, 11, 12, 13].

### **Іонна природа дії нейромедіаторів на гладенькі м'язи**

Збуджувальний, чи гальмуючий ефект нейромедіаторів залежить від того, які іони беруть участь у змінах мембранної провідності, викликані дією цих медіаторів на відповідні мембранні рецептори. При цьому особливе значення для регуляції скорочення ГМК має здатність нейромедіатора індукувати вхід чи вивільнення кальцію. У вісцеральних гладеньких м'язах, зокрема у м'язах ШКТ, ацетилхолін є основним збуджувальним нейромедіатором. М.Ф. Шуба почав вивчати дію ацетилхоліну на показники електротону вісцеральних гладеньких м'язів ще у

60-х роках минулого сторіччя. При цьому особливу увагу він приділяв саме питанням іонної природи холінергічного збудження [16]. На сучасному рівні дослідження мембранних провідностей ГМК, пов'язаних з активацією підтипів мускаринових холіорецепторів, розвивав у відділі докт. біол. наук О.В. Жолос. З середини 90-х років ці дослідження переросли у предмет тісного наукового співробітництва відділу з лабораторією клінічної фармакології Госпіталю Святого Георгія при Лондонському університеті, очолюваною відомим спеціалістом в галузі фізіології, фармакології і біофізики гладеньких м'язів проф. Томасом Болтоном. Необхідно зазначити, що М.Ф. Шуба та Т. Болтон познайомилися ще у 1974 р. під час стажування обох у лабораторії проф. Едіт Бюлбрінг у Оксфордському університеті, і їх тісні наукові контакти зберігалися впродовж усього життя Михайла Федоровича. У відповідних дослідженнях були встановлені пряма роль рецепторів  $M_2$ -типу і дозвільна функція рецепторів  $M_3$  типу в активації мускаринових катіонних каналів, а також визначена роль G-білків у передачі сигналу від рецептора та регуляції потенціалзалежності цих каналів [36, 37, 38]. Нещодавно за участю вихованців відділу О.В. Жолоса та В.В. Цвіловський з використанням «нокаутних» тварин була остаточно розшифрована молекулярна природа холінергічного збудження ГМК ШКТ, яка, як виявилось, базується на активації двох типів рецепторкерованих кальційпроникних катіонних каналів родини TRP (від англ. Transient Receptor Potential), а саме TRPC4 і TRPC6 [32]. Дослідженням того, які молекулярні системи входу, вивільнення, захоплення та виведення кальційю в ГМК регулюються тими чи іншими нейромедіаторами займалася у відділі група канд. біол. наук Д.В. Гордієнко. Такого типу дослідження могли ефективно проводитися тільки із застосуванням лазерної конфокальної мікроскопії та флуоресцентних барвників, здатних мітити як іони кальцію, так і субклітинні структу-

ри. Оскільки таке складне інструментальне забезпечення в Україні було недоступне, ці роботи також проводилися на колаборативній основі з лондонською лабораторією проф. Т. Болтона. Результатом цих робіт став опис подій локального вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з саркоплазматичного (СР) ретикулула ГМК, отримання безпосередніх і деталізованих даних з наявності кальційіндукованого вивільнення кальцію (CICR) з СР різних типів ГМК, аналіз ультраструктури, просторової організації та обчислення об'єму СР живих свіжоізолюваних ГМК [20, 23, 24]. Було зроблено висновок, що просторова організація СР ГМК забезпечує збільшення щільності місць вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  у поздовжньому напрямку і таким чином сприяє розповсюдженню кальцієвих хвиль вздовж гладеньком'язової клітини під час скорочення, викликане дією медіаторів.

### Клінічні аспекти досліджень

М.Ф. Шуба опікувався не тільки розвитком фундаментальних досліджень в галузі фізіології та біофізики гладеньких м'язів, а і намагався використати їх результати для розробок в прикладній медицині. Так, наприклад, із співробітникам кафедри хірургії Київського медінституту були проведені спільні дослідження синаптичної передачі, дії медіаторів та модуляторів синаптичної передачі на ізольовані смужки гладеньких м'язів шлунка, тонкої і товстої кишки людини (хворих, оперованих з приводу виразки шлунка та дванадцятипалої кишки, доброякісних і злоякісних пухлин тощо). Відомо, що оперативне втручання на органах черевної порожнини нерідко супроводжується післяопераційними парезами ШКТ. За наявними нині уявленнями, одна з причин післяопераційних парезів – посилення гальмівного впливу симпатичної нервової системи внаслідок рефлекторної активації адренергічних нейронів. У медичній практиці для усунення цього гальмування використовують перидуральну анестезію, симпатолітики і адреноблокатори, що, однак,

не завжди призводить до бажаних результатів. Вважається, що однією з можливих причин недостатньої ефективності такого лікування може бути активація стійких до дії адреноблокаторів пурінергічних нейронів ентерального нервового сплетіння. Відсутність специфічного блокатора пурінергічного гальмування ускладнює встановлення причин післяопераційних парезів і поки не дає змоги їх усувати спрямованим впливом на цей тип гальмування.

Крім виключення адренергічного гальмування, в лікувальній практиці використовується також метод фармакологічної стимуляції моторно-евакуаторної функції ШКТ за допомогою антихолінестеразних засобів (прозерин, убретид). Однак у разі поширення запального процесу на нервові терміналі, виділення ацетилхоліну припиняється, і введення прозерину виявляється неефективним.

У регуляції рухової активності ШКТ, крім класичних нейромедіаторів, беруть також участь і інші фізіологічно активні речовини, що вивільнюються нейронами ентерального сплетіння. Особливої уваги заслуговує серотонін оскільки в гангліях мієнтерального сплетіння наявні серотонінергічні нейрони, що передбачає їх можливе залучення в регуляцію та модуляцію рухової активності. У порівнянні з іншими органами і тканинами організму, гладенькі м'язи травного тракту людини мають найбільш високу чутливість до дії цього аміну. Крім того, серотонін впливає на перистальтичну активність. Для встановлення механізмів дії серотоніну на гладенькі м'язи ШКТ і доцільності його застосування в клініці для лікування післяопераційних парезів Михайлом Федоровичом була ініційована спільна робота з кафедрою хірургії Київського медичного інституту ім. О.О.Богомольця з вивчення впливу цього аміну на гладенькі м'язи тонкої й товстої кишки людини.

Проведені у відділі дослідження ефектів серотоніну на гладенькі м'язи різних відділів ШКТ показали, що він викликає найбільшу збуджувальну дію у початковому відділі

тонкої кишки (рис. 4). Вона слабкішає в абсорбальному напрямку і вже в початкових відділах товстої кишки збудливий ефект не проявляється зовсім (див. рис. 4). При цьому одночасне розслаблення гладеньких м'язів товстої кишки, викликане серотоніном, полегшує перистальтичну активність [5].

Проведені клінічні спостереження на більш як сотні хворих, які перенесли оперативне втручання на органах черевини і мали післяопераційні порушення моторно-евакуаторної функції травного тракту, показали, що підшкірне введення серотоніну (10 мг) на 2-гу – 3-тю добу післяопераційного періоду стимулювало перистальтичну активність і знімало здуття живота. Введення серотоніну не викликало побічних явищ з боку серцево-судинної та дихальної систем. Отже, проведені з нашою безпосередньою участю клініко-експериментальні дослідження дали можливість рекомендувати серотонін як засіб для лікування післяопераційних парезів кишечника.

### Підсумок

Академік М.Ф. Шуба є засновником школи з вивчення гладеньких м'язів в Україні та на теренах колишнього СРСР. В Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України йому вдалося створити унікальний науковий колектив, який, незважаючи на багато обмежень радянської доби і складнощі пострадянського періоду розвитку науки в Україні, здобув міжнародне визнання. Михайло Федорович зробив декілька важливих концептуальних кроків у фізіології гладеньких м'язів таких, як відкриття електричного зв'язку між ГМК та нехолінергічного синаптичного збудження в інтестинальних гладеньких м'язах. М.Ф. Шубою разом зі спіробітниками і учнями було показано ефективне блокування апаміном пуринаергічного компонента синаптичної передачі, складну медіаторну та іонну природу неадренергічних синаптичних потенціалів, два можливих механізми генерації пуринаергічного та NO-ергічного компонентів

ГСП: перший - вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  із інозитолтрифосфатчутливого кальцієвого депо й активації апамінчутливих кальційзалежних калієвих каналів малої провідності, і другий – вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  із ріанодинчутливого кальцієвого депо й активації кальційзалежних калієвих каналів великої провідності, виявлено фосфоліпаза С-залежний та незалежний копоненти синаптичного гальмування, досліджено фармакобіофізичні властивості апамінчутливого компонента кальційзалежного калієвого струму ГМК, іонні механізми та кальцієву сигналізацію холінергічного збудження.

Праці акад. Шуби М.Ф. ще тривалий час будуть надихати молодих учених і досвідчених фахівців в галузі фізіології та біофізики гладеньких м'язів на нові творчі пошуки. Науковий колектив, керований Михайлом Федоровичом, повернувшись до фізіології гладеньких м'язів багато талановитої молоді, давши змогу їй отримати відмінні дослідницькі навички та здобути наукові ступені. Дякуючи міжнародній репутації Михайла Федоровича, багатьом з його учнів вдалося продовжити кар'єру за кордоном і стати відомими міжнародними вченими. Таким чином Михайло Федорович Шуба підживлював полум'я науки та фізіології гладеньких м'язів у самій Україні й одночасно давав йому шлях для виходу на більш широкі міжнародні простори.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Артеменко Д.П., Бурый В.А., Владимирова И.А. Шуба М.Ф. Модификация метода одиночного сахарозного мостика // Фізіол. журн. – 1988. – **28**, №3. – Р. 374–380.
2. Байдан Л.В., Владимирова И.А., Мирошников А.И., Таран Г.А. Действие апаминна на синаптическую передачу в различных типах синапсов // ДАН СССР. – 1978. – **241**, №5. – Р. 1224–1227.
3. Владимирова, И.А., Шуба М.Ф. Влияние стрихнина, гидрастина и апаминна на синаптическую передачу в гладкомышечных клетках // Нейрофизиология / Neurophysiology. – 1978. – **10**, №3. – Р. 295–299.
4. Владимирова И.А., Шуба М.Ф., Синаптические процессы в гладеньких мышцах // Там же. – 1984. – **16**, №3. – Р. 307–319.
5. Владимирова И.А., Вовк Е.В., Черпак Б.Д., Шуба М.Ф.

- Дія серотоніну на ізольовані гладенькі м'язи шлунково-кишкового тракту людини і можливість його застосування в клініці // *Фізіол. журн.* – 1986. – **32**, №6. – С. 671–680.
6. Владимірова І.А., Филиппов І.Б., Кулієва Е.М., Діска Ю.Б., Ганиткевич В.Я. Отличия клеточных механизмов АТФ- и норадреналин-индуцированного торможения гладеньких мышц в условиях селективной и совместной активации  $M_2$ - или  $M_3$ -холинорецепторов // *Нейрофизиология / Neurophysiology.* – 2007. – **39**, № 1. – Р.22–31.
7. Воронцов Д.С., Шуба М.Ф. Физический электротон нерва и мышцы / К.: Наук. думка, 1966. – Р. 214
8. Груша М.М., Романенко О.В. Синаптичне гальмування в гладеньких м'язах ободової кишки у людей різних вікових груп // *Нейрофизиология / Neurophysiology.* – 2012. – **4**, № 2. – С. 128–136.
9. Загороднюк В.П., Шуба М.Ф. Природа неадренергического торможения в гладеньких мышцах кишечника // Там же. – 1986. – **18**, № 3. – Р. 373–381.
10. Романенко О.В., Груша М.М., Фомін П.Д. Блокувальна дія піридоксаль-5'-фосфату на неадренергічне синаптичне гальмування гладеньких м'язів тонкого кишечника людини // *Фізіол. журн.* – 2006. – **52**, № 1. – С. 62–70.
11. Романенко О.В., Груша М.М. Синаптичне гальмування гладеньких м'язів ободової кишки людини та вплив на нього вітаміну  $B_6$  і його похідних // *Нейрофизиология / Neurophysiology.* – 2006. – **38**, № 4. – С. 269–279.
12. Романенко О.В., Груша М.М. Вплив піридоксаль-5'-фосфату на синаптичне гальмування гладеньких м'язів кишки людини на фоні дії ізоніазиду // *Експерим. та клініч. фізіологія і біохімія.* – 2006. – **35**, № 3. – С. 98–103.
13. Романенко А.В. Груша М.М. Действие галоперидола, клотримазола и пиридоксаль-5'-фосфата на синаптическую передачу в гладеньких мышцах ободочной кишки человека // *Нейрофизиология / Neurophysiology.* – 2007. – **9**, № 4/5 – С. 408–411.
14. Филиппов І.Б., Владимірова І.А., Ганиткевич В.Я. Шуба М.Ф. Модуляция аденилатциклазой взаимодействия возбуждающих и тормозящих синаптических влияний на гладкие мышцы // Там же. – 2004. – **36**, №5/6. – Р. 443–445.
15. Филиппов І.Б., Владимірова І.А., Кулієва Е.М. Шуба М.Ф. Участие вторичных внутриклеточных посредников в механизмах пуринергического торможения интестинальных гладеньких мышц // *Нейрофизиология.* – 2010. – **42**, №3. – С.192–199.
16. Шуба М.Ф. Дія ацетилхоліну на фізіологічний електротон гладеньких м'язів // *Фізіол. журнал.* – 1962. – **8**. – Р. 449–455.
17. Abbraccio M.P and Burnstock G. Purinoceptors: Are there families of P2X and P2Y purinoceptors? // *Pharmacol. Ther.* – 1994. – **64**. – Р. 445–475.
18. Banks B.E. Brown C., Burgess G.M. Burnstock G., Claret M., Cocks T.M., Jenkinson D.H. Apamin blocks certain neurotransmitter – induced increase in potassium permeability // *Nature.* – 1979. – **282**, № 5707. – Р. 415–417.
19. Boeynaems J.M., Communi D., Savi P., Herbert J.M. P2Y receptors: in the middle of the road. *Trends. Pharmacol. Sci.* – 2000. – **21**. – Р.1–3.
20. Bolton T.B., Prestwich S.A., Zholos A.V., Gordienko D.V. Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles // *Ann. Rev. Physiol.* – 1999. – **61**. – Р. 85–115.
21. Burnstock G., Campbell, G., Satchell D., Smythe A. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic nerves in the gut // *Brit. J. Pharmacol.* – 1970. – **40**. – Р. 668–688.
22. Fredholm B.B., Abbraccio M.P., Burnstock G., Daly J.W., Harden K.T., Jacobson K.A., Leff P., Williams M. Nomenclature and classification of purinoceptors // *Pharmacol. Rev.* – 1994. – **46**. – Р. 143–156.
23. Gordienko D.V., Zholos A.V., Shuba M.F., Bolton T.B. Mechanisms of calcium signaling in smooth muscle cells explored with fluorescence confocal imaging // *Neurofizyologiya/Neurophysiology.* – 2004. – **36**. – Р. 455–465.
24. Gordienko D.V., Harhun M.I., Kustov M.V., Pucovsky V., Bolton T.B. Sub-plasmalemmal  $[Ca^{2+}]_i$  upstroke in myocytes of the guinea-pig small intestine evoked by muscarinic stimulation:  $IP_3R$ -mediated  $Ca^{2+}$  release induced by voltage-gated  $Ca^{2+}$  entry // *Cell Calcium.* – 2008. – **43**. – Р. 122–141.
25. Hoyle C.H., Vladimirova I.A., Burnstock G. Pre- and postjunctional actions of purine and xanthine compounds in the guinea-pig caecum circular muscle // *Brit. J. Pharmacol.* – 1988 – **9**, №2. – Р. 653–663.
26. Kegelman I., Wetter A. Molecular pharmacology of P2Y receptors // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* – 1997. – **7**. – Р. 310–323.
27. Povstyan A.V., Zima A. V., Harhun M.I. Shuba M.F. Properties of the apamin-sensitive component of  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  current in smooth muscle cells of the guinea-pig taenia coli // *Neurofizyologiya / Neurophysiology.* – 2000. – **32**, № 1. – Р. 63–87.
28. Shuba M.F., Vladimirova I.A. Effect of apamin on the electrical responses of smooth muscle to adenosine 5'-triphosphate and to non-adrenergic, non-cholinergic nerve stimulation // *Neuroscience.* – 1980. – **5**. – Р.853–859.
29. Shuba M.F. Vladimirova I.A. Action of apamin on nerve-muscle transmission and the effect of ATP and noradrenaline in smooth muscles // 28<sup>th</sup> International congress of physiological sciences // Budapest. – 1980. – Pergamon press. – Р. 111–126.
30. Shuba M. F., Vladimirova I. A., Philypov I. B. Mechanism of the inhibitory action of neurotransmitters on smooth muscles // *Neurofizyologiya / Neurophysiology* // 2003. – **35**, № 3/4. – Р. 252–261.
31. Shuba M.F., Vladimirova I.A., Ermakova T.O., Jurkiewicz A. Mechanisms of nonadrenergic noncholinergic synaptic transmission in smooth muscle cells of the gastrointestinal

- tract // Neurofizyologiya / Neurophysiology. – 1998. – **30**, № 4/5. – P. 208–212.
32. Tsvilovskyy V.V., Zholos A.V., Aberle T. Philipp S.E., Dietrich A., Zhu M.X., Birnbaumer L., Freichel M., Flockerzi V. Deletion of TRPC4 and TRPC6 in mice impairs smooth muscle contraction and intestinal motility in vivo // Gastroenterology. – 2009. – **137**. – P. 1415–1424.
  33. Vladimirova I.A., Zagorodnyuk V.P., Ostrovsky I.V., Sorokina Z.A., Chizhnikov I.V., Shuba M.F. Ultrasound-induced changes in synaptic processes with different transmitters in smooth muscle // Neurofizyologiya / Neurophysiology. – 1993. – **24**, № 4. – P. 251–255.
  34. Zagorodnyuk V.H., Vladimirova I.A., Vovk E.V., Shuba M.F. Studies of the inhibitory nonadrenergic neuromuscular transmission in the smooth muscle of the normal human and from a case of Hirschsprung's disease // J. Auton. Nerv. Syst. – 1989. – **26**, № 4. – P. 51–60.
  35. Zagorodnyuk V.P., Zima A.V., Vladimirova I.A., Shuba M.F. Nitric oxide as a nonadrenergic inhibitory transmitter in smooth muscle cells of the guinea pig gastrointestinal tract: mechanism of action // Neurofizyologiya / Neurophysiology. – 1994. – **26**, №2. – P. 86–91.
  36. Zholos A.V., Bolton T.B. G-protein control of voltage dependence as well as gating of muscarinic metabotropic channels in guinea-pig ileum // J. Physiol. – 1994. – **478**. – P. 195–202.
  37. Zholos A.V., Bolton T.B. Muscarinic receptor subtypes controlling the cationic current in guinea-pig ileal smooth muscle // Brit. J. Pharmacol. – 1997. – **122**. – P. 885–893.
  38. Zholos A.V., Tsytsyura Y.D., Philippov I.B., Shuba M.F., Bolton T.B. Voltage-dependent inhibition of the muscarinic cationic current in guinea-pig ileal cells by SK&F 96365 // Ibid. – 2000. – **129**, № 4. – P. 695–702.

*Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України,  
Київ*

*E-mail: irinav@biph.kiev.ua*

*Матеріал надійшов до редакції 30.08.2013*



Рис. 1. Апамін-викликане пригнічення неадренергічного гальмування (а) та АТФ-викликаної гіперполяризації (б) гладком'язових клітин *taenia coli* морської свинки. На а: 1 – гальмівні синаптичні потенціали гладком'язових клітин (ГСП ГМК) та АТФ-викликана гіперполяризація до дії апаміну, 2, 3, 4, 5 – після 1-, 2-, 3-, 5-ї хвилини дії апаміну ( $0,5 \text{ мкмоль/л}$ ) відповідно; на б: 2 – АТФ-викликана деполаризація після 20 хв дії апаміну. Стрілки вниз – момент додавання речовин у розчин Кребса, вверх – початок відмивання препарату нормальним розчином Кребса [29]

Рис. 2. Комплексна медіаторна та іонна природа гальмівних синаптичних потенціалів гладком'язових клітин шлунково-кишкового тракту. На а: 1 – двокомпонентний гальмівний синаптичний потенціал (ГСП), який виникає у відповідь на поодинокі інтрамуральне електричне подразнення гладеньких м'язів дистального відділу товстої кишки морської свинки, 2 – апамінечутливий компонент ГСП, що відводиться після блокування першого АТФ-залежного компонента апаміном ( $5 \times 10^{-7} \text{ моль/л}$ , 15 хв), 3 – синаптична відповідь при сумісній дії апаміну та блокатора NO-синтази L-NAME ( $10^{-4} \text{ моль/л}$ , 12 хв) [33]. На б-в: 1 – гальмівні синаптичні потенціали гладком'язових клітин (ГСП ГМК) сліпої та товстої кишки морської свинки, 2 – апамінвикликане ( $5 \times 10^{-7} \text{ моль/л}$ , 20 хв) блокування ГСП ГМК обох відділів кишечника, 3 – апамін разом з блокатором калієвої провідності тетрастиламонієм (ТЕА,  $2 \text{ ммоль/л}$ , 10 хв). Нехолінергічні збуджувальні синаптичні потенціали (ЗСП) в ГМК сліпої кишки (б, 3) досягли порога генерації потенціалів дії, а ЗСП в гладеньких м'язах дистального відділу товстої кишки (в, 3) при сумісній дії апаміну і ТЕА не виявлені [30]

Рис. 3. Дія блокатора фосфоліпази С U73122 на гальмівні та збуджувальні потенціали та NO-ергічний компонент гальмівних синаптичних потенціалів (ГСП) сліпої (а, б) та товстої (в) кишки морської свинки. На а: 1 – контроль, 2 – зменшення ГСП під дією U73122 ( $10^{-5} \text{ моль/л}$ , 30 хв), 3 – сумісна дія U73122 й апаміну ( $5 \times 10^{-7} \text{ моль/л}$ , 30 хв). На б: 1 – контроль, 2 – збуджувальні синаптичні потенціали (ЗСП) на 30-й хвилині дії апаміну, 3 – резистивний ЗСП до дії U73122 (апамін та U73122). На в: 1 – контроль, 2 – апамінрезистивний компонент ГСП (апамін,  $10^{-7} \text{ моль/л}$ , 30 хв), 3 – апамінрезистивний компонент ГСП не чутливий до дії U73122 ( $10^{-5} \text{ моль/л}$ , 30 хв), 4 – зменшення тривалості ГСП під впливом L-NNA ( $10^{-4} \text{ моль/л}$ ) за наявності U73122 [30]

Рис. 4. Збуджувальний (а) і гальмівний (б) ефект серотоніну ( $10^{-6} \text{ моль/л}$ ) на гладенькі м'язи тонкої та товстої кишки людини: а – електрична (1) та скорочувальна (1а) активність м'язової смужки, тонкої кишки, відповідно, б – ідентичність ефектів серотоніну й АТФ (гіперполяризація, виникнення спонтанних і зменшення викликаних гальмівних синаптичних потенціалів (ГСП) на гладком'язові клітини кільцевого шару товстої кишки (1,а – спонтанний ГСП на більшій швидкості розгортки) [5]. Стрілки вниз – момент додавання речовин у розчин Кребса, вверх – початок відмивання препарату нормальним розчином Кребса [29]

## АВТОРАМ ПРО ЖУРНАЛ

Для публікації в «Фізіологічному журналі» приймаються оригінальні статті з основних розділів фізіології, а також огляди (на замовлення редакції), які відображають найбільш актуальні її проблеми, статті з історії вітчизняної та світової фізіологічної науки, які висвітлюють генезис і еволюцію ідей, виникнення та розвиток наукових шкіл, творчі портрети вчених, забуті імена науки, дискусійні статті, рецензії на статті та нові видання, наукову хроніку, оформлені відповідно наступних вимог.

### Подання та робота з рукописами

Автор подає рукопис статті у друкованому вигляді (два примірники, разом з оформленим ліцензійним договором) та в електронній формі.

Друковані примірники рукопису можна надіслати звичайною поштою (простим листом) або особисто принести до редакції.

В електронному форматі рукопис можна подати на компакт-диску (у разі відправлення поштою вкласти його до конверта разом з друкованими примірниками), на USB-накопичувачі (тільки під час подання особисто!) або електронною поштою як прикріплені файли.

Компакт-диск і USB-накопичувач мають бути попередньо перевірені надійною антивірусною програмою і містити тільки файли рукопису.

Правила оформлення рукопису подано нижче.

### Поштова адреса редакції:

Редакція “Фізіологічний журнал”, Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, вул. Богомольця, 4, Київ 24, 01024

Телефон для довідок: 256-25-27; 253-07-45

Адреса електронної пошти:

fiziol\_z@biph.kiev.ua

Матеріали статті – текст, резюме, список літератури, підписи до рисунків і таблиці – оформлюються одним файлом. Окремим файлом оформлюється кожний рисунок. Усі сторінки рукопису нумеруються. Крім того, в тексті слід указати де саме треба розмістити рисунки/таблиці. Формат файлів для тексту і таблиць – документ MS Word (doc, docx або rtf), для рисунків та іншого ілюстративного

матеріалу – tif, bmp, wmf, gif, jpg, eps або pdf.

На окремій сторінці варто навести відомості про авторів: прізвище, ім'я, по батькові, поштову і обов'язково електронну адреси, номери службових й домашніх телефонів із кодом міста, номери мобільних телефонів. Якщо авторів кілька і вони працюють у різних установах, слід позначити арабськими цифрами (індексами) у кінці прізвищ авторів відповідність установам, в яких вони працюють.

Датою отримання рукопису вважається дата надходження його до редакції. У разі одержання статті, оформленої з порушенням цих правил, редакція залишає за собою право статтю не приймати, не рецензувати і не повертати авторам, про що їх повідомляє.

Поданий до журналу рукопис обов'язково рецензується провідними спеціалістами у відповідній галузі. У разі необхідності рукопис направляється авторам на доопрацювання. Після доопрацювання рукопису згідно із зауваженнями рецензентів автор надсилає його до редакції разом із відповідями рецензентові протягом одного місяця. Рукопис, що отримав недостатньо високу оцінку рецензентів, відхиляється як невідповідний профілю та вимогам до рівня публікацій журналу.

Для контрольного ознайомлення з відредагованою статтею редакція надсилає авторові електронною поштою верстку, яку треба терміново вчитати і не пізніше трьох наступних днів електронною поштою повідомити редакцію про виявлені помилки (зазначивши сторінку, колонку, абзац, рядок, де слід зробити виправлення) або про їх відсутність. На цій стадії роботи з рукописом не дозволяється заміна тексту, рисунків, таблиць. Якщо відповідь від авторів вчасно не надійшла, редакція залишає за собою право затримати публікацію статті.

### Загальні вимоги до рукописів

Обсяг експериментальної роботи зі списком цитованої літератури, таблицями та рисунками з підписами, що пояснюють одержані результати (все на окремих сторінках), має не перевищувати 20 сторінок (40 тис. знаків), огляду – 30 сторінок (60 тис. знаків), надрукованих на принтері.

Рисунки, фотографії, схеми тощо можуть бути чорно-білими або кольоровими.

Рукопис статті має бути підписаний кожним автором.

Наприкінці статті після списку літератури додаються назва статті, ініціали та прізвища авторів, офіційні назви установ, де виконано роботу, електронна адреса. Резюме і ключові слова російською та англійською мовами відповідно до оригінального українського тексту. Якщо статтю написано російською чи англійською мовою, ця інформація подається відповідно українською та англійською чи українською та російською мовами.

#### **Окремі вимоги до оформлення рукопису**

##### *Текст*

Шрифт – Times New Roman; кегль 14 (таблиці – кегль 10); інтервал між рядками – 1,5. *Таблиці та ілюстративний матеріал*

Усім колонкам у таблицях слід дати назву і вони мають бути заповнені відповідними даними (якщо дослід не проводили, треба ставити “-“, а якщо показники не встановлено – “0”).

На фотовідбитках зазначається їх верх.

На полях рукопису слід помітити місця розташування рисунків і таблиць.

##### *Структура рукопису*

УДК

Назва статті

Ініціали та прізвища автора (-ів)

Назва установи, де було виконано роботу

Електронна адреса для листування

Резюме і ключові слова

Вступ

Методика

Результати та їх обговорення

Висновки

Подяка

Список літератури

#### **Резюме і ключові слова**

В резюме стисло висвітлюються основні результати дослідження.

Резюме має включати основні розділи:

- актуальність
- постановку проблеми,
- шляхи вирішення поставленої задачі,
- результати,
- висновки.

#### **Вступ (без назви)**

На початку статті стисло викладається історія питання з посиланням на джерела літератури

та обґрунтування мети дослідження.

#### **Методика**

Розділ “Методика” має бути поданим так, щоб за наведеним описом методів і реактивів, умов проведення дослідів можна було би відтворити експерименти. На загальновідомі методи досить дати посилання на публікації. Слід навести назви фірм та зазначити країни-виробники реактивів і матеріалів, які було використано в дослідях; вид і кількість дослідних тварин і обов’язково застосовані методи знеболювання та евтаназії.

Цифрові результати слід заокруглювати згідно з ustalеними правилами, враховуючи середню похибку дослідів. Вірогідність відмінностей показників слід обґрунтувати статистичним аналізом, посилаючись на конкретні методи. Не можна наводити одні й ті самі результати в таблицях і на рисунках. Слід також вказати за допомогою якої програми було зроблено статистичний аналіз одержаних результатів, як подано результати, який довірчий інтервал або розподіл величин.

Усі позначення і найменування фізичних і хімічних одиниць вимірювання наводять у системі СІ.

Скорочення слів (аббревіатури), крім загальновідомих, у таблицях і в підписах до рисунків наводити не варто (за деяким винятком, в цьому разі обов’язковим розшифруванням їх у примітках). Не слід також, окрім загальноприйнятих скорочень, наводити у статті довільно скорочені короткі слова (наприклад, так як каталаза тощо).

#### **Результати та їх обговорення**

У цьому розділі слід уникати прямого повторення результатів таблиць. Обговорення результатів потрібно обмежити розглядом лише найважливіших встановлених фактів з урахуванням попередніх даних щодо питання, що вивчалось. Іншими словами, більша частина обговорення має бути присвячена інтерпретації результатів.

#### **Висновки (без назви)**

**Список літератури.** Для зручної та швидкої обробки вашої роботи в реферативних базах пропонуємо подавати список літератури в форматі Vancouver Style, опис якого можна знайти за адресою: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

---

## ЛІЦЕНЗІЙНИЙ ДОГОВІР НА ВИКОРИСТАННЯ ТВОРУ

м. Київ

«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 201\_ р.

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України як засновник та видавць журналу «Фізіологічний журнал (далі – «Виконавець»)» в особі директора академіка НАН України О.О.Криштала, що діє на підставі Статуту, з одного боку, та Автор(и)

---

(Прізвище, ім'я, по-батькові автора(ів))

(далі – «Автор», з іншого боку, разом іменовані «Сторони», підписали цей Договір (майнове виключне право) про наступне:

1. Автор(и) безоплатно надають Видавцю виключну ліцензію на друк та використання письмового твору (далі «Стаття»)

---

---

---

---

в тому числі права дозволяти або забороняти використання Статті або її частини третіми особами у будь-якій формі і будь-якими способами.

2. З моменту підписання цього договору (за умови прийняття Статті «до друку») Видавцеві належить право оприлюднити, редагувати, адаптувати і модифікувати, перекладати на іншу мову, видавати, а також розповсюджувати Статтю необмеженим накладом у будь-якому вигляді та форматі на різних носіях інформації і будь-якими способами.

3. Ліцензія на використання Статті надається Видавцю на весь термін дії авторського права на зазначену вище Статтю і має силу на території всіх країн світу.

4. Виконавець набуває право субліцензувати права, отримані за цим Договором, іншим установам та особам.

5. Всі копії Статті як паперові, так і електронні (включаючи CD, DVD та інші електронні засоби масової інформації, Інтернет і інші мережі передачі даних і бази даних), мають містити інформацію про авторські права Видавця і повне бібліографічне посилання на Статтю.

6. У разі, якщо рукопис Статті не буде прийнято до друку протягом 18 місяців (про що Автору буде повідомлено в письмовій формі) або відкликано Автором до прийняття Статті «до друку», цей Договір втрачає силу і анулюється, а авторські права повертаються Автору.

7. Видавець підтверджує збереження за Автором наступних прав:

- авторське немайнове право згідно з чинним законодавством України;
  - патентні права, права на торгівельні марки і права на будь-які процеси, речовини, матеріали та методи, описані у Статті;
  - права на виготовлення різних копій, зокрема електронних, винятково для власного використання або колегами Автора за умови, що копії Статті не будуть використані ним для продажу та для систематичного розповсюдження;
  - права наступного використання Автором всієї Статті або будь-яких її частин в оглядах, дисертаційних роботах, книгах, лекціях.
-



---

8. Автор гарантує, що Стаття не була раніше надрукована і не буде надрукована будь-де до її публікації Видавцем, а також те, що авторські права на її публікацію не передавались іншим видавництвам.

9. Автор гарантує, що Стаття є оригінальною роботою Автора і не є копією будь-якої іншої роботи. Автор гарантує, що ним одержано всі необхідні дозволи на використання матеріалів у своїй Статті, що охороняються авторським правом.

10. Автор гарантує, що використання Видавцем авторських прав, набутих внаслідок цього Договору, не спричинить порушення авторських прав будь-яких осіб або організацій, а також не призведе до розголошення секретних або конфіденційних відомостей.

11. Видавець має право встановлювати правила (умови) прийому та опублікування матеріалів Журналу. Редколегії журналу належить виключне право відбору та/або відхилення матеріалів, що надсилаються до редакції з метою їх опублікування. Рукопис, що спрямовується Автором (Співавторами) до редакції, поверненню не підлягає. Листування щодо відхилення статті редколегією Журналу не підтримує. Видавець не несе відповідальність за неправдиву інформацію надану авторами.

12. Договір є чинним з дати його підписання Сторонами та укладається на термін чинності авторського права на Статтю. Відносини, що не врегульовані цим Договором, регулюються чинним законодавством України.

13. Автори виключно для цілей виконання даного договору надають для внутрішнього користування Видавця згоду на обробку та використання зазначених у цьому Договорі персональних даних згідно з Законом України “Про захист персональних даних”. Усі положення цього Закону роз’яснені Видавцем Автору.

14. Всі доповнення, додатки, акти складаються Сторонами в письмовому вигляді і підписуються вповноваженими представниками Сторін.

15. Цей Договір складено у двох примірниках українською мовою, тексти яких автентичні, по одному для кожної зі Сторін.

#### **Підписи Сторін:**

##### **Автор**

П.І.Б. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Адреса: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Тел. \_\_\_\_\_ E-mail: \_\_\_\_\_

Підпис \_\_\_\_\_

##### **Видавець**

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця  
НАН України

вул. Богомольця, 4, 01024, Київ, Україна

Тел. (044) 256-25-27

E-mail: fiziol\_z@biph.kiev.ua

Директор Інституту,

академік НАН України

О.О. Кришталь

Підпис \_\_\_\_\_



---

## ЛІЦЕНЗІЙНИЙ ДОГОВІР НА ВИКОРИСТАННЯ ТВОРУ

---

м. Київ

«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 201\_ р.

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України як засновник та видавць журналу «Фізіологічний журнал (далі – «Виконавець»)» в особі директора академіка НАН України О.О.Кришталя, що діє на підставі Статуту, з одного боку, та Автор(и)

---

(Прізвище, ім'я, по-батькові автора(ів))  
(далі – «Автор», з іншого боку, разом іменовані «Сторони», підписали цей Договір (майнове виключне право) про наступне:

1. Автор(и) безоплатно надають Видавцю виключну ліцензію на друк та використання письмового твору (далі «Стаття»)

---

---

---

в тому числі права дозволяти або забороняти використання Статті або її частини третіми особами у будь-якій формі і будь-якими способами.

2. З моменту підписання цього договору (за умови прийняття Статті «до друку») Видавцеві належить право оприлюднити, редагувати, адаптувати і модифікувати, перекладати на іншу мову, видавати, а також розповсюджувати Статтю необмеженим накладом у будь-якому вигляді та форматі на різних носіях інформації і будь-якими способами.

3. Ліцензія на використання Статті надається Видавцю на весь термін дії авторського права на зазначену вище Статтю і має силу на території всіх країн світу.

4. Виконавець набуває право субліцензувати права, отримані за цим Договором, іншим установам та особам.

5. Всі копії Статті як паперові, так і електронні (включаючи CD, DVD та інші електронні засоби масової інформації, Інтернет і інші мережі передачі даних і бази даних), мають містити інформацію про авторські права Видавця і повне бібліографічне посилання на Статтю.

6. У разі, якщо рукопис Статті не буде прийнято до друку протягом 18 місяців (про що Автору буде повідомлено в письмовій формі) або відкликано Автором до прийняття Статті «до друку», цей Договір втрачає силу і анулюється, а авторські права повертаються Автору.

7. Видавець підтверджує збереження за Автором наступних прав:

- авторське немайнове право згідно з чинним законодавством України;
- патентні права, права на торгівельні марки і права на будь-які процеси, речовини, матеріали та методи, описані у Статті;
- права на виготовлення різних копій, зокрема електронних, винятково для власного використання або колегами Автора за умови, що копії Статті не будуть використані ним для продажу та для систематичного розповсюдження;
- права наступного використання Автором всієї Статті або будь-яких її частин в оглядах, дисертаційних роботах, книгах, лекціях.

8. Автор гарантує, що Стаття не була раніше надрукована і не буде надрукована

будь-де до її публікації Видавцем, а також те, що авторські права на її публікацію не передавались іншим видавництвам.

9. Автор гарантує, що Стаття є оригінальною роботою Автора і не є копією будь-якої іншої роботи. Автор гарантує, що ним одержано всі необхідні дозволи на використання матеріалів у своїй Статті, що охороняються авторським правом.

10. Автор гарантує, що використання Видавцем авторських прав, набутих внаслідок цього Договору, не спричинить порушення авторських прав будь-яких осіб або організацій, а також не призведе до розголошення секретних або конфіденційних відомостей.

11. Видавець має право встановлювати правила (умови) прийому та опублікування матеріалів Журналу. Редколегії журналу належить виключне право відбору та/або відхилення матеріалів, що надсилаються до редакції з метою їх опублікування. Рукопис, що спрямовується Автором (Співавторами) до редакції, поверненню не підлягає. Листування щодо відхилення статті редколегією Журналу не підтримує. Видавець не несе відповідальність за неправдиву інформацію надану авторами.

12. Договір є чинним з дати його підписання Сторонами та укладається на термін чинності авторського права на Статтю. Відносини, що неврегульовані цим Договором, регулюються чинним законодавством України.

13. Автори виключно для цілей виконання даного договору надають для внутрішнього користування Видавця згоду на обробку та використання зазначених у цьому Договорі персональних даних згідно з Законом України “Про захист персональних даних”. Усі положення цього Закону роз’яснені Видавцем Автору.

14. Всі доповнення, додатки, акти складаються Сторонами в письмовому вигляді і підписуються вповноваженими представниками Сторін.

15. Цей Договір складено у двох примірниках українською мовою, тексти яких автентичні, по одному для кожної зі Сторін.

Підписи Сторін:

Автор

П.І.Б. \_\_\_\_\_

НАН України

Україна

Адреса: \_\_\_\_\_

Видавець

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця

вул. Богомольця, 4, 01024, Київ,

Тел. (044) 256-25-27

E-mail: fiziol\_z@biph.kiev.ua

Директор Інституту,  
академік НАН України

Тел. \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_

О.О. Кришталь

Підпис \_\_\_\_\_

Підпис \_\_\_\_\_

## CONTENTS

N.A. Strutynska, N.Dorofeyeva, G.L.Vavilova, V.F. Sagach. Hydrogen sulfide Inhibits $\text{Ca}^{2+}$ -induced mitochondrial permeability transition pore opening in spontaneously hypertensive rats	3
R.B. Strutynskyi, R.A. Rovenets, N.A. Strutynska, A.P. Neshcheret, A.A.Moibenko. The influence of activation of the atp-sensitive potassium channels by flocalin on the function of the cardiovascular system	11
H.V. Opanasenko, L.V. Bratus, B.L.Gavenauskas, O.O. Gonchar, I.M. Mankovska, V.I. Nosar, S.B.Frantsuzova. Disturbances periodontal tissues oxygen dependet processes under prolonged immobilization stress and ways of their pharmacological correction	17
K.O.Tokarchuk, L.G. Kapustyanenko, S.G. Shandrenko. The role of aldehydes in development of oxidative stress under rhabdomyolysis in rats	25
Yu.V. Danylovyh, A. Ju.Chunikhin, G.V. Danylovyh. Investigation of the changes in uterine myocytes size depending on contractile activity modulators by photon correlation spectroscopy	32
T.V. Vovkun, P.I. Yanchuk, L.Y. Shtanova, S.P. Veselsky, V.A. Baranovsky. The influence of corvitin on secretory processes and blood flow in the rat gastric mucosa	40
V.V. Trush, V.I. Sobolev. Modulation of the effects of dexamethasone in rat skeletal muscle by testosterone	47
V.I. Khorevin, A.V. Gorkovenko, I.V. Vereshchaka. Relationship between muscle activity and kinematics of the lower extremity in slow motions of squats in humans	56
L. Gunina, I. Chekman, T. Nebesna, N. Gorchakova. Effectiveness of use of $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids at physicol loads	68
I.N. Mikheyteva. Protective action of melatonine in experimental glaucoma in rats	78
I.V. Kompanets, O.G. Korotkiy, V.V. Nikolska, L.I. Ostapchenko, S.V. Pilipenko. The interferon production by rat spleen and thymus lymphocytes in condititons of hypoacidity	84
Yu.O.Tischenko, V.V.Kiroshka. Dynamics of morphological and functional development of ovarian tissue allografts	89
V.V. Vereshchaka. Externus changes in the face soft tissues is the marker of degenerative changes of collagen	97
S.P. Beschasyi. Effect of chronic sensorineural hearing loss at several indicators of immune and endocrine systems of children 7–11 years	110
M.S. Shypshyna, M.S. Veselovsky. Pre- and postsynaptic expression mechanisms of long-term depression at rats glutamatergic primary afferent synapses on dorsal horn spinal cord neurons in co-culture	117
Radchenko V.G. Overactive bladder syndrome: etiology, pathogenesis, treatment	124
<b>CHRONICLS</b>	129
<b>JUBILEE DATES</b>	
Vadim Berezovsky (on his 80th birthday)	135